

GLYKOPÉPTIDEILLE VASTUSTUSKYKYISTEN ENTEROKOKKIEN TUNNISTUS PCR- JA MIKROSIRUHYBRIDISAATIO-TEKNIIKOIDEN AVULLA

Petri Saarinen
Maisterintutkielma
Helsingin yliopisto
HEBIOT
Biotekniikka
04/2014

Tiedekunta/Osasto Fakultet/Sektion – Faculty Maatalous-metsätieteellinen tiedekunta		Laitos/Institution– Department HEBIOT Helsingin seudun biotekniikan koulutusohjelma	
Tekijä/Författare – Author Petri Saarinen			
Työn nimi / Arbetets titel – Title Glykopeptideille vastustuskykyisten enterokokkien tunnistus PCR- ja mikrosiruhybridisaatio- tekniikoiden avulla			
Oppiaine /Läroämne – Subject Biotekniikka			
Työn laji/Arbetets art – Level Maisterintutkielma	Aika/Datum – Month and year 13.05.2014	Sivumäärä/ Sidoantal – Number of pages 85	
<p>Tiivistelmä/Referat – Abstract</p> <p>Enterokokit ovat gram-positiivisia bakteereita, jotka ovat osa ihmisen suoliston normaaliflooraa. Vaikka enterokokkeja pidetään yleisesti harmittomina, kuuluu sukuun useita lajeja, joiden tiedetään aiheuttavan mm. sepsikseen johtavia verenkiertoinfektioita ihmisissä. Koska enterokokit ovat luonnostaan vastustuskykyisiä lukuisille antibiooteille, on niiden aiheuttamien infektioiden lääkinnässä perinteisesti käytetty glykopeptidejä, joiden käyttö on yleensä aloitettu vasta kun muiden antibioottien teho ei riitä. Viime vuosien aikana glykopeptideille vastustuskykyisten enterokokkien (GRE) yleistyminen on kuitenkin tuottanut maailmanlaajuisesti ongelmia potilaan hoitoon ja sen myötä myös klinikoille ja mikrobiologianlaboratorioille, minkä vuoksi nopeiden ja tarkkojen menetelmien tarve GRE:n ja glykopeptideille herkkien enterokokkikantojen erotteliseksi on merkittävästi kasvanut.</p> <p>Tässä tutkimuksessa kehitettiin PCR- ja mikrosirutekniikoiden yhdistelmään perustuva menetelmä kliinisesti merkittävimpien GRE:n tunnistamiseksi. Menetelmä kehitettiin osaksi kaupallista Prove-it™ Sepsis- testiä, jonka avulla jo ennestään pystyttiin tunnistamaan kaksi yleisintä enterokokkilajia, <i>Enterococcus faecalis</i> ja <i>Enterococcus faecium</i>. Tutkimuksen aikana testin tunnistuspaneelia laajennettiin glykopeptidiesistenssiä aiheuttavia ligaasi-entsyymejä koodaavilla <i>vanA</i>- ja <i>vanB</i>-geeneillä sekä kahdella luontaisesti glykopeptideille vastustuskykyisellä enterokokkilajilla, <i>Enterococcus casseliflavus</i> ja <i>Enterococcus gallinarum</i>illa. <i>VanA</i>- ja <i>vanB</i>-geeneille suunniteltiin alukkeet, joiden avulla Huslabista (Suomi) saatujen GRE-kantojen ligaasigeenit voitiin sekvensoida. Saadun sekvenssidatan perusteella suunniteltiin alukkeet molempien geenien spesifiseen monistukseen sekä tunnistuskoettimet alukkeiden monistamien PCR-tuotteiden tunnistamiseksi. <i>E.casseliflavus</i>in ja <i>E.gallinarum</i>in kohdalla tunnistus perustui Prove-it™ Sepsis yleisbakteeri-PCR:llä monistetun <i>gyrB</i>-geenin em. lajeille spesifisiin alueisiin, joihin suunniteltiin kummallekin lajille spesifiset tunnistuskoettimet.</p> <p>Suunnittelun tuloksena saatiin useita alukkeita <i>vanA</i>- ja <i>vanB</i>-geenien monistamista sekä useita tunnistuskoettimia alukkeiden monistamien tuotteiden tunnistamista varten. Myös <i>E.gallinarum</i>- ja <i>E.casseliflavus</i>-spesifisiä tunnistuskoettimia suunniteltiin useita. Sekä <i>vanA</i>- että <i>vanB</i>-geenien tunnistusta varten valittiin yksi alukepari, joka lisättiin osaksi Prove-it™ Sepsis -PCR:ää. Lisäksi kunkin kohdegeenin tunnistusta varten Prove-it™ Sepsis -mikrosirulle printattiin neljää erilaista geeni- tai lajispesifistä tunnistuskoetinta. Muokatulla Prove-it™-testillä testattiin 12 kliinistä alkuperää olevaa puhdasviljelmänäytettä, jotka saatiin pariisilaisen sairaalan, <i>Hôpital de Bicêtre</i>n, klinisen mikrobiologian laboratoriosta. Testatuista näytteistä 11/12 tuotti PCR- ja mikrosiru-pohjaisella menetelmällä yhtenäisen tunnistuksen <i>Hôpital de Bicêtre</i>n referenssituloksiin verrattaessa.</p>			
<p>Avainsanat – Nyckelord – Keywords</p> <p>Antibioottiresistenssi, Enterokokki, Glykopeptidi, GRE, Mikrosiruhybridisaatio, PCR, Sepsis, vanA, vanB, vanC</p>			
<p>Säilytyspaikka – Förvaringställe – Where deposited</p> <p>Viikin tiedekirjasto ja Maataloustieteiden laitos</p>			
<p>Muita tietoja – Övriga uppgifter – Additional information</p> <p>Ohjaaja ja opintosuunnan vastuuhenkilö: Minna Mäki ja Kari Elo</p>			

Tiedekunta/Osasto Fakultet/Sektion – Faculty Agriculture and Forestry		Laitos/Institution– Department HEBIOT Helsinki Region Biotechnology Educational Programme	
Tekijä/Författare – Author Petri Saarinen			
Työn nimi / Arbetets titel – Title Identification of glycopeptide resistant enterococci by PCR and microarray hybridization			
Oppiaine /Läroämne – Subject Biotechnology			
Työn laji/Arbetets art – Level Master's Thesis	Aika/Datum – Month and year 13.05.2014	Sivumäärä/ Sidoantal – Number of pages 85	
<p>Tiivistelmä/Referat – Abstract</p> <p><i>Enterococci</i> is a group of gram positive bacteria part of human intestinal flora. While generally harmless, several species of the group are known to cause severe infections in humans, including bloodstream infections leading to sepsis. Since <i>Enterococci</i> are naturally resistant to many antibiotics, the use of glycopeptides, considered a "last resort" drugs, is common in treatment of enterococcal infections. In recent years, however, the emergence of glycopeptide resistant <i>Enterococci</i> (GRE) has been an increasing concern for clinics and microbiology laboratories around the world, creating a need for fast and accurate screening tests differentiating the glycopeptide resistant <i>Enterococcus</i> strains from the non-resistant ones.</p> <p>In this study, a combined PCR and microarray hybridization based method for identification of the clinically most prevalent GRE was established as a part of commercial sepsis diagnostic test called Prove-it™ Sepsis. Already identifying the most common <i>Enterococcus</i> species (<i>E.faecium</i> and <i>E.faecalis</i>), the detection of glycopeptide resistance causing ligase genes <i>vanA</i> and <i>vanB</i> and species level identification of intrinsically glycopeptide resistant <i>E.gallinarum</i> and <i>E.casseliflavus</i> were added as part of the the test. Primers were designed for sequencing <i>vanA</i> and <i>vanB</i> genes and multiple strains, provided by a Finnish clinical laboratory Huslab, were sequenced. Sequence regions unique to these genes were identified according to sequence alignment data containing the sequenced gene regions and other relevant sequences found in public sequence databases. Based on these data, primers were designed for the amplification of the selected gene regions. For identification of the amplified gene regions, a set of hybridization probes were designed and printed on microarray. In addition, probes for identifying <i>E.casseliflavus</i> and <i>E.gallinarum</i> were designed based on sequence alignment data gathered from Mobidiag Ltd. private biobank. The identification of these species was based on topoisomerase encoding <i>gyrB</i> gene amplified by the Prove-it™ Sepsis broad range PCR.</p> <p>Several primers for the amplification of <i>vanA</i> and <i>vanB</i> genes were designed and one primer pair for each was selected to be integrated to the Prove-it™ Sepsis multiplex-PCR. Similarly, multiple hybridization probes were designed for detecting <i>vanA</i>, <i>vanB</i>, <i>E.casseliflavus</i> and <i>E. gallinarum</i>. Four probes for each target gene region were selected to be integrated to the commercial test. With this modified test, 12 pure culture samples of clinical origin were tested and the results were compared to the ones provided by the laboratory of clinical microbiology of <i>Hôpital de bicêtre</i> (Paris, France). Results provided by the modified PCR and microarray test were identical to the reference results in 11 out of 12 cases.</p>			
<p>Avainsanat – Nyckelord – Keywords</p> <p>Antibiotic resistance, Enterococci, Glycopeptide, GRE, Micoarray hybridization, PCR, Sepsis, <i>vanA</i>, <i>vanB</i>, <i>vanC</i></p>			
<p>Säilytyspaikka – Förvaringställe – Where deposited</p> <p>Viikki Science Library and Department of Agricultural Sciences</p>			
<p>Muita tietoja – Övriga uppgifter – Additional information</p> <p>Supervisor and responsible person of the discipline: Minna Mäki and Kari Elo</p>			

Sisällysluettelo

1. Johdanto	8
1.1 Sepsis	9
1.1.1 Patologia	10
1.1.2 Taudinkuva	11
1.1.3. Hoito	12
1.2 Sepsisdiagnostiikka	12
1.2.1 Veriviljely	13
1.2.2 Antibioottiherkkyyismääritykset	14
1.2.3 Molekyyliagnostiset ja muut viljelyyn perustumattomat menetelmät	14
1.3 Enterokokit	16
1.3.1 Mikrobiologiset ominaisuudet	16
1.3.2 Glykopeptideille vastustuskykyiset enterokokit (GRE:t)	17
1.3.3 Epidemiologia ja sairausassosiaatiot	17
1.3.4 Patogeneesi	19
1.4 Glykopeptidiresistenssi	20
1.5.1 <i>VanA</i>	22
1.5.2 <i>VanB</i>	23
1.5.3 <i>VanC</i>	24
1.6 Prove-it™ Sepsis -testi	25
1.6.1 PCR	27
1.6.2 Mikrosiruhybridisaatio	29
1.6.3 Tulosten analysointi ja raportointi	30
2. Tutkimuksen tavoitteet ja merkitys	31
3. Aineisto ja menetelmät	32
3.1 Näytteet	32
3.2 Kasvatusolosuhteet	33
3.3 DNA:n eristys	33
3.4 Sekvensointi eli DNA:n emäsjärjestyksen selvittäminen	34

3.5 Sekvenssien analysointi	36
3.5 Tunnistuskoeettimien ja alukkeiden suunnittelu	37
3.5.1 <i>E. casseliflavus</i> ja <i>E. gallinarum</i>	37
3.5.2 <i>vanA</i> , <i>vanB1</i> ja <i>vanB2</i> -geenit	38
3.6 Testausmenetelmät.....	40
4. Tulokset	44
4.1 Suunnitellut alukkeet ja tunnistuskoeettimet.....	44
4.2 <i>vanA</i> -, <i>vanB1</i> - ja <i>vanB2</i> -geenien tunnistamiseen tarkoitettujen alukkeiden ja tunnistuskoeettimien testaus	47
4.2.1 Parhaiden alukkeiden ja tunnistuskoeettimien valinta	47
4.2.2 Herkkyyskokeet valituille aluke-tunnistuskoeetin yhdistelmille	53
4.3 <i>E. casseliflavusille</i> ja <i>E. gallinarumille</i> suunniteltujen tunnistuskoeettimien signaali-intensiteettikokeet kohdelajista eristettyjen DNA-näytteiden kanssa	57
4.4 <i>E. casseliflavusille</i> ja <i>E. gallinarumille</i> suunniteltujen tunnistuskoeettimien signaali-intensiteettikokeet muiden kuin kohdelajista eristettyjen DNA-näytteiden kanssa ..	58
4.5 Herkkyyskokeet <i>E. casseliflavus</i> - ja <i>E. gallinarum</i> -tunnistuskoeettimille	64
4.6 Testaus <i>Hôpital de bicêtre</i> 'stä saaduilla puhtasviljelmäkannoilla	66
5. Tulosten tarkastelu	67
5.1 Tunnistuskoeettimien ja alukkeiden suunnittelu	67
5.2 Resistenssigeenien tunnistukseen suunniteltujen alukkeiden ja tunnistuskoeettimien testaus	68
5.3 <i>E. casseliflavusille</i> ja <i>E. gallinarumille</i> suunniteltujen tunnistuskoeettimien testaus	69
5.4 Herkkyystestaukset	71
5.5 Testaus <i>Hôpital de bicêtre</i> 'stä saaduilla puhtasviljelmäkannoilla	72
6. Johtopäätökset.....	73
7. Kiitokset.....	74
Lähdeluettelo	74

Lyhenneluettelo

A	Adeniini
AGE	Agarose gel electrophoresis; agaroosigeelielektroforeesi
AST	Antibiotic susceptibility testing; antibioottiherkkyystesti
BLAST	Basic local alignment search tool; sekvenssilinjaustyökalu
Bp	Base pair; emäspari
BSA	Bovine Serum Albumin; naudan seerumin albumiini
C	Sytosiini
D-ala	D-alaniini
D-lac	D-laktaatti
DNA	Deoksiribonukleiinihappo
D-ser	D-seriini
dNTP	Deoksiribonukleotidi
G	Guaniini
GyrB	Gyraasi B; DNA-gyraasi, alayksikkö B
GRE	Glycopeptide resistant Enterococcus; Glykopeptideille vastustuskykyinen enterokokki
HRP	Piparjuuriperoksidaasi
IL-1	Interleukiini-1
L-ala	L-alaniini
MIC	Minimum inhibitory concentration; antibiootin bakteerikasvua inhiboiva vähimmäiskonentraatio
MRSA	Metisilliinille vastustuskykyinen <i>Staphylococcus aureus</i>
MurF	Urasiilidifosfaatti-N-asetyylimuramiini- pentapeptidi syntetaasi

PCR	Polymeraasiketjureaktio
PYR	Pyrrolidonyyli- β -naptylamidi
RNA	Ribonukleiinihappo
SIRS	Systemic Inflammatory Response Syndrome; systeeminen tulehdusvastesyndrooma
TE-puskuri	Tris:ia ja EDTA:ta sisältävä puskuriliuos
TNF	Tuumorinekroositekijä
UDP	Uraasilidifosfaatti
UTI	Urinary tract infection; virtsatieinfektio
VanA	D-ala-D-ala -dipeptidiä tuottava ligaasi
VanB	D-ala-D-lac -dipeptidiä tuottava ligaasi
VanC	D-ala-D-ser -dipeptidiä tuottava ligaasi

1. Johdanto

Enterokokit ovat gram-positiivisia bakteereita, jotka ovat osa ihmisen suoliston normaaliflooraa. Vaikka enterokokkeja pidetään pääsääntöisesti harmittomina, kuuluu sukuun useita lajeja, jotka kykenevät aiheuttamaan erinäisiä infektioita ihmisessä. Vakavimmillaan infektiot voivat edetä verenkiertoon ja aiheuttaa hengenvaarallisen yleisinfektion, sepsiksen. Sepsiksessä infektion aiheuttama bakteeri leviää elimistöön verenkierron välityksellä ja aiheuttaa voimakkaan immunologisen vasteen, SIRS:n (Systeeminen tulehdusvastesyndrooma), jonka seurauksena voi olla elinten vajaatoimintaa ja lopulta jopa kuolema. Kuten muitakin infektioita, hoidetaan sepsistä pääsääntöisesti antibiooteilla. Taudinkuvan vakavuudesta johtuen, on erityisen tärkeää, että lääkitys on tehokas ja aloitetaan mahdollisimman nopeasti. Viime vuosien aikana on kuitenkin havaittu yhä enenevässä määrin bakteerikantoja, joihin vain harvat antibiootit tehoavat. Horisontaalisen geenisiirron avulla bakteerit voivat hankkia resistenssigeenejä muidenkin kuin oman lajinsa, tai sukunsa edustajilta, minkä vuoksi pelkän bakteerilajin perusteella ei enää voida päätellä luotettavasti taudinaiheuttajan kykyä vastustaa eri antibioottien vaikutuksia. Jo luonnostaan moniresistenttien enterokokkien kohdalla ongelma on erityislaatuinen, sillä perinteisesti niiden aiheuttamiin infektioihin on ollut käytössä vain yksi antibioottiryhmä, glykopeptidit. Viime vuosien aikana glykopeptideille vastustuskykyiset enterokokit (GRE:t) ovat nousseet esille yhtenä sairaaloiden ja kliinisten mikrobiologian laboratorioden merkittävimmistä ongelmista, niiden potilashoitoon aiheuttamien haasteiden seurauksena. Enterokokit elävät vaikeissakin olosuhteissa ja ottavat herkästi vastaan vierasperäistä geneettistä informaatiota, minkä vuoksi GRE-kantojen leviäminen erityisesti sairaaloiden sisällä on merkittävä ongelma.

Enterokkien glykopeptidiresistenssi perustuu bakteerin soluseinän peptidoglykaanisynteesin muutokseen, joka johtuu peptidoglykaanin alayksikköjä tuottavan ligaasi-entsyymin mutaatiosta. Glykopeptidiresistenssiä on kuvattu useita eri genotyyppisiä, joista kliinisesti merkittävimmiksi ovat osoittautuneet *vanA*-, *vanB*- ja *vanC*-genotyypit, joista kukin on nimetty mutatoituneen ligaasi-entsyyminsä mukaan. Kahden ensiksi mainitun genotyypin on todettu olevan transposoni- tai plasmidi-

välitteisiä eli horisontaalisesti siirtyviä kun taas vanC-genotyyppi on kromosomaalinen, joka on luonnostaan kaikilla *Enterococcus casseliflavus* ja *Enterococcus gallinarum* lajien edustajilla.

Tämän tutkimuksen tarkoituksena oli kehittää PCR- ja mikrosiruhybridisaatiotekniikoita yhdistelevä menetelmä, jonka avulla on mahdollista tunnistaa kaikki kliinisesti merkittävät GRE:t nopeasti. Menetelmän lähtökohdaksi otettiin suomalaisen Mobidiag- yrityksen kehittämä Prove-it™ Sepsis -teknologia, joka on nimensä mukaisesti kehitetty sepsisdiagnoosiin varten. Tutkimuksessa kaupallisen Prove-it™ Sepsis -testin olemassa oleva tunnistuspaneeli laajennettiin kattamaan VanA- ja VanB-ligaaseja koodaavat *vanA*- ja *vanB*-geenit sekä Prove-it™ Sepsis -yleisbakteeri -PCR:n monistaman *gyrB*-geenin *E. gallinarum*ille ja *E. casseliflavus*ille spesifiset alueet. Lisäksi GRE- tunnistuksessa hyödynnettiin testin jo olemassa olevaa kykyä tunnistaa kaksi yleisintä enterokokkilajia, *Enterococcus faecalis* ja *Enterococcus faecium*. Tavoitteena oli, että laajennuksen myötä testi pystyisi luotettavasti kertomaan käyttäjälleen onko testattu DNA-näyte peräisin jostakin lajeista *E. faecium*, *E. faecalis*, *E. gallinarum* tai *E. casseliflavus* ja onko kyseessä olevalla enterokokkikannalla glykopeptidiresistenssiä aiheuttava geeni *vanA* tai *vanB*.

1.1 Sepsis

Sepsis voidaan määritellä kehon tietynlaisena vasteena infektiioon, joka voi esiintyä paikallisesti tai levinneenä verenkiertoon (Abraham ym., 2003). Bakteerien aiheuttama sepsis johtaa niin lasten kuin aikuistenkin kohdalla usein kuolemaan, mikäli oikeaa hoitoa ei kyetä ajoissa aloittamaan. Noin 20 miljoonaa sepsis-tapausta ilmenee maailmanlaajuisesti vuosittain ja tehokkaista antibioottihoidoista huolimatta noin 135 000 eurooppalaista ja 215 000 amerikkalaista kuolee tautiin joka vuosi (Tissari ym. 2010, Angus ja Wax, 2001). Epäsopivat laajakirjoiset antibioottihoidot, joita aloitetaan ilman tartunnan aiheuttavan bakteerin tunnistamista tai tietoa sen vastustuskyvystä eri antibiooteille, lisäävät sairaallosuutta ja kuolleisuutta (Davey ym. 2008). Rutiinidiagnostiikassa sepsiksen taudinaiheuttajien tunnistaminen verestä perustuu yleisimmin veriviljelyyn, jonka avulla positiivinen tulos eli tieto siitä, että potilaalla on

veressään bakteeri, saadaan noin 1-3 päivässä. Tämän lisäksi saattaa kulua usein yhdestä kahteen päivää ennen kuin infektion aiheuttaja ja sen antibioottiherkkyydet on saatu selville (Tissari ym. 2009).

1.1.1 Patologia

Septisillä potilailla havaitaan usein poikkeamia hemostaasissa, mikä ilmenee veren epäsäännöllisenä hyytymisenä. Hyytymistä saattaa esiintyä tarpeettomissa tilanteissa, jolloin verenkierto suonissa hidastuu ja riski sisäelinten ja kudosten vahingoittumiseen kasvaa (Remick, 2007). Hemostaasi on monimutkainen biologinen prosessi, minkä vuoksi selkeää, vain sepsikselle ominaista, veren hyytymisen häiriömekanismia ei ole kyetty kuvaamaan.

Poikkeuksellisen hemostaasin lisäksi sepsispotilailla todetaan usein epänormaali immuunivaste, joka voi olla eksessiivinen tai supressoitunut. Eksessiivisen immuunivasteen yhteydessä proinflammatoristen molekyylien, kuten tuumorinekroositekijän (TNF) tai interleukiini-1:n (IL-1), erityis kasvaa, mikä ylimitoitettuna saattaa johtaa kudus- ja elinvaurioihin. Joillain potilailla todetaan vastaavasti supressoitunut immuunivaste, jolloin proinflammatoristen molekyylien erityis on vajauksellista. Tällöin joidenkin anti-inflammatoristen sytokiinien erityis on suhteellisesti ylimitoitettua ja potilaan elimistö reagoi infektiin vajavaisesti. Käytännössä tämä tarkoittaa sitä, että sepsistä voidaan tapauksesta riippuen joutua hoitamaan tulehdusreaktiota supressoivin tai sitä stimuloivin keinoin (Remick, 2007).

Viimeisen vuosikymmenen aikana on osoitettu, että sepsiksen yhteydessä esiintyy myös useiden eri solutyypin apoptoosia eli ohjelmoitunutta solukuolemaa. Yleisintä apoptoosin kasvu on lymfosyyttien kohdalla, mutta myös makrofaagien ja eri kudosten epiteelisolujen yhteydessä kohonnutta apoptoosifrekvenssiä on havaittu. Nykytiedon valossa on kuitenkin epäselvää miten ja missä määrin ohjelmoituneen solukuoleman kasvu vaikuttaa sepsiksen aiheuttamaan elinten vajaatoimintaan (Ayala ym., 2008). Toisin kuin lymfosyyttien ja makrofaagien tapauksessa, neutrofiilien määrä veressä usein kasvaa ja niiden elinikä pidentyy. Neutrofiilit soveltuvat erinomaisesti patogeenien eliminoimiseen, mutta niiden on havaittu aiheuttavan myös kudusvaurioita. Tästä

johtuen neutrofiilien määrän vaikutus sepsiksen patologiseen prosessiin on varsin dikotominen ja siten niiden osuus elinten vajaatoiminnan kehittymiseen on epäselvä (Brown ym., 2006).

Kuten edellä on kuvattu, sepsiksen aiheuttamat toiminnalliset poikkeamat ovat moninaisia ja ne liittyvät useisiin eri elimiin ja elintoimintoihin. Tästä johtuen selkeää ja kokonaisvaltaista patologista kuvausta sepsikselle ei ole kyetty antamaan, mikä puolestaan vahvistaa käsitystä taudin haastavuudesta kliinisestä näkökulmasta tarkasteltuna.

1.1.2 Taudinkuva

Sepsikseen assosioidaan monia eri oireita, joista osa kytkeytyy voimakkaasti infektion alkuperään. Yleisesti sepsiksen oireisiin voidaan lukea kuumeilu, etenkin taudin alkuvaiheessa. Toisaalta kaikissa tapauksissa kuumetta ei ole, vaan ruumiinlämpö voi olla jopa normaalia matalampi. Myös hengitysvaikeudet, lämmin iho, takykardia sekä yleinen heikko olo ovat usein oireina. Infektion lähteestä riippuen oireina voi esiintyä myös virtsaamiskipuja (infektion lähde virtsatiet), limaista sylkeä (keuhkoinfektio), päänsärkyä, valoherkkyyttä, niskan jäykkyyttä (keskushermostoinfektio kuten meningiitti) tai vatsakipua (vatsainfektion tapauksessa) (Abraham ym., 2003). Vuonna 1992 ACCP/SCCM (ACCP – *American College of Chest Physicians*, SCCM – *Society of Critical Medicine*) konsensuskonferenssikomitea määritteli, että sepsis on tila, jossa infektion lisäksi esiintyy niin kutsuttu SIRS (*systemic inflammatory response syndrome*). SIRS määriteltiin kyseisessä konferenssissa potilaan fysiologisenä tilana, jossa vähintään kaksi seuraavista ehdoista täyttyy (Bone ym., 1992):

- Ruumiinlämpö yli 38°C tai alle 36°C
- Sydämen lyöntitiheys yli 90 lyöntiä minuutissa
- Hengitystiheys yli 20 hengityskertaa minuutissa tai valtimoveren verikaasuanalyysistä saatu hiilidioksidin (CO₂) osapaine on alle 32 mmHg
- Valkosolujen määrä veressä yli 12 000/mm³ tai alle 4000/ mm³ tai neutrofiilien osuus veren kypsymättömistä valkosoluista on vähintään 10 %.

Taudin yhteydessä esiintyy lisäksi bakteereja tai muita mikro-organismeja ruumiineritteissä kuten veressä, syljessä tai virtsassa (Abraham ym., 2003).

Sepsis voidaan jakaa kolmeen eri asteeseen. Pelkkä sepsis tai septisemia on useimmiten oireiltaan lievä eikä sairaalahoitoa tarvita. Vakava sepsis kehittyy kun sepsiksen yhteydessä ilmenee sisäelimiä vajaatoimintaa. Septisen shokin yhteydessä potilaan verenpaine laskee, mikä johtaa yhden tai useamman sisäelimen vakavaan vajaatoimintaan tai jopa toiminnan romahtamiseen. Septisen shokin yhteydessä elimet eivät saa tarpeeksi happea toimiakseen kunnolla. Septisen shokin mortaliteetti on n. 50 %. (Abraham ym., 2003).

1.1.3. Hoito

Vakavan sepsiksen omaavat potilaat ovat useimmiten hyvin sairaita ja tarvitsevat tyypillisesti teho-hoitoa. Hoitoon kuuluu usein muun muassa antibioottihoito infektiota vastaan ja verenpainetta kohottava tai sydämen toimintaa parantava muu lääkehoito. Erittäin vakavissa tapauksissa voidaan joutua turvautumaan myös kirurgiaan tai elintoimintojen koneelliseen ylläpitämiseen (kuten hengitys- tai munuaiskonehoito) (Abraham ym., 2003). Tuoreimpina hoitomuotoina on käytetty aktivoitua proteiini C:tä sekä steroideja, mutta kummankin käyttö on toistaiseksi kokeellista ja niiden tehosta esiintyy eriäviä mielipiteitä (Annane ym., 2004, Bernard ym., 2001, Nadel ym., 2007, Patel ja Balk, 2012).

1.2 Sepsisdiagnostiikka

Kaikkiin sepsiksen muotoihin liittyy aina bakteremia tai fungemia (bakteeri tai sieni veressä), vaikkakaan aina bakteremian tai fungemian toteaminen ei tarkoita, että potilaalla on sepsis (Bone ym., 1992). Käytännössä tämä tarkoittaa sitä, että sepsisepäilyn yhteydessä potentiaalisen taudinaiheuttajan tunnistaminen tapahtuu potilaan verestä. Kultaisena standardina sepsisdiagnostiikassa käytetään tällä hetkellä veriviljelyä, jonka avulla voidaan tunnistaa potilaan veressä olevia eläviä bakteeri- tai

sienisoluja (Wilson ym., 2007). Positiivinen veriviljelytulos itsessään ei kuitenkaan anna tarkempaa määrittelyä patogeenista vaan veriviljelyä seuraa sarja erilaisia, patogeenin tarkempaan määrittelyyn tähtääviä, biokemiallisia testejä. Myös antibioottiherkkyytestaukset (AST – antibiotic susceptibility testing) ovat tärkeä osa veriviljelyn jälkeen tehtävää jatkotestausta. Vaikka sepsiksen empiirinen antimikrobiaalinen lääkehoito aloitetaan useimmiten jo ennen positiivisen veriviljelytuloksen toteamista voi patogeenin tarkempaan määrittämiseen ja sen myötä optimaalisen antibiootihoidon aloittamiseen kulua tunteja ja pahimmassa tapauksessa jopa päiviä veriviljelypositiivisen tuloksen havaitsemisesta (Munson ym., 2002). Sepsiksen yhteydessä tehokkaan hoidon aloittaminen ajoissa on erityisen tärkeää ja jopa muutaman tunnin nopeampi patogeeninmääritys voi olla merkittävässä roolissa hoitotuloksen kannalta. Sepsisdiagnostiikan parantamiseksi on viime vuosien aikana kehitetty useita uusia, patogeenin viljelyyn perustumattomia menetelmiä, joiden toivotaan paitsi nopeuttavan, myös tarkentavan tämän hetkisiä patogeenintunnistusmenetelmiä (Mancini ym., 2010).

1.2.1 Veriviljely

Veriviljelyssä potilaalta otettua verinäytettä laitetaan veriviljelypulloon, jota seisotetaan ravistellen bakteerinkasvatuskaapissa, sellaisessa lämpötilassa, joka on ihanteellinen bakteerien kasvun kannalta. Sekä anaerobisille että aerobisille bakteereille on olemassa omat veriviljelypullonsa. Bakteerikasvu havaitaan pullossa useimmiten punasolujen hajoamisena, kaasukuplina viljelynesteessä tai esimerkiksi nesteen sameutena. Veriviljelypulloja tulee tarkkailla päivittäin, jotta jatkotestaus näytteelle voidaan aloittaa mahdollisimman pian. Usein käytetään myös veriviljelyautomaatteja, joiden toiminta perustuu bakteerikasvuston aineenvaihduntatuotteiden kuten hiilidioksidin, optisen tiheyden eli viljelynesteeseen sameuden tai pH:n muutoksen määrittämiseen (Wilson ym. 2007). Kun veriviljely on todettu positiiviseksi, tehdään gram-värijäys sekä erilaisia biokemiallisia kokeita taudinaiheuttajan lajin määrittämiseksi (Baron ym., 2002).

1.2.2 Antibioottiherkkyysmääritykset

Antibioottiherkkyystestauksen tarkoituksena on määritellä mikro-organismien herkkyys jollekin antibiootille. Eri testausmenetelmät voidaan jakaa diffuusio- ja laimennospohjaisiin menetelmiin sekä näitä molempia hyväksikäyttäviin yhdistelmämenetelmiin. Diffuusiopohjaisissa menetelmissä, kuten Kirby-Bauer-menetelmässä, herkkyystestauksen kohteena olevaa mikro-organismia viljellään maljalle, johon on asennettu antibioottia sisältäviä kiekkoja. Mikro-organismien herkkyys tietylle antibiootille määritellään kiekkojen ympärille muodostuvan inhibitoalueen eli mikrobikasvustoa sisältämättömän alueen perusteella. Laimennospohjaisissa menetelmissä herkkyystestauksen kohteena olevaa mikrobia viljellään eri antibioottikonsentraatioille kyllästetyissä maljoissa tai liemissä, jonka jälkeen mikrobikasvuston perusteella voidaan määrittää niin kutsuttu MIC-arvo (*minimum inhibitory concentration*) eli testattavan antibiootin vähimmäiskonsentraatio, jossa mikrobin kasvu on merkittävästi estynyt. Epsilometer-testi eli E-testi on nykyisin laajalti käytetty menetelmä, jossa sekä diffuusio- että laimennosmenetelmät ovat hyödynnettyinä. E-testissä mikrobia viljellään maljalle, johon on asennettu tiettyä antibioottia asteittain laimenevassa konsentraatiossa sisältävä suorakaiteen muotoinen muovinen liuska. Mikrobin testattavalle antibiootille spesifinen MIC-arvo voidaan lukea suoraan liuskan pienimmän konsentraation kohdalta, josta mikrobikasvusto alkaa (Cockerill, 1998). Vaikka nykyisin käytetyt antibioottiherkkyystestauksen menetelmät ovat olleet tunnettuja jo vuosikymmenien ajan, on AST-testien automaatiossa tapahtunut suuria harppauksia viimeisen vuosikymmenen aikana (Flemingham ja Brown, 2001, Jörgensen ym., 2000).

1.2.3 Molekyyliagnostiset ja muut viljelyyn perustumattomat menetelmät

Lukuisista hyödyistään huolimatta, veriviljelyllä katsotaan yleisesti olevan myös merkittäviä heikkouksia nopeaan ja tarkkaan mikrobitunnistukseen tähdättäessä. Eräs tärkeimmistä puutteista on näyttemateriaalin, eli veren, suuri vaadittava määrä, joka

suositusten mukaan tulisi olla 20—30 mL per veriviljelypullo (Wilson ym., 2007). Useat tutkimukset ovat vahvistaneet veriviljelyn herkkyyden olevan merkittävästi riippuvainen käytettävänä olevasta verimäärästä (Bouza ym., 2007, Arpi ym., 1989). Etenkin vastasyntyneiden sepsispotilaiden tapauksessa ongelma on merkittävä. Tämä siksi, että verinäytteen kokonaismäärän ei tulisi olla yli 1 % potilaan koko veritilavuudesta, joten pienten lasten kohdalla edellä mainittuja suositusten mukaisia verimääriä ei viljelyyn ole saatavilla (Wilson ym., 2007, Isaacman ym., 1996). Toisena puutteena voidaan mainita menetelmän hitaus. Veriviljelypulloja tulee tarkkailla päivittäin, jotta jatkotestaus näytteelle voidaan aloittaa mahdollisimman pian (Beekmann ym., 2003). Erityisen vaikea tilanne on silloin kun infektion aiheuttajana on hidaskasvuinen tai ravintovaatimuksiltaan vaikeasti tyydytettävä patogeeni. Bakteerien kasvuun voi myös vaikuttaa aiempi tai käynnissä oleva potilaan antibioottihoito (Fenollar ja Raoult, 2007). Veriviljely ei itsessään myöskään anna suoraa määritystä patogeenin lajin suhteen vaan veriviljelyn jälkeen tarvitaan aina gram-värijäys ja useimmiten myös muita biokemiallisia kokeita, jotta infektion aiheuttaja saadaan tarkasti selville ja siten spesifinen antibioottihoito voidaan aloittaa (Munson ym., 2002).

Edellä mainitut veriviljelyä koskevat puutteet ovat osaltaan luoneet painetta kehittää nopeampia ja tarkempia testejä erityisesti sepsisdiagnostiikan alalle. Useat uudet sepsisdiagnostiikkaan soveltuvat innovaatiot perustuvat elävien mikro-organismien tunnistamisen sijaan nukleiinihappomäärittäykseen. Nukleiinihappomäärittäyksissä infektion aiheuttaja pyritään tunnistamaan DNA:n tai RNA:n perusteella. Myös muita elävän patogeenin viljelyyn perustumattomia menetelmiä on kuvattu. Nukleiinihappomäärittäykseen perustuvat diagnostiset testit (*Nucleic acid based technologies* – NAT) ovat vasta viime vuosien aikana alkaneet jalkautumaan mikrobiologian laboratorioden rutiinikäyttöön, vaikka niiden hyödyntämisen tekniikat ovat monissa tapauksissa olleet jo pitkään tunnettuja tieteellisen perustutkimuksen piirissä. Virologian laboratorioden osalta vastaavat tekniikat ovat olleet käytössä jo pidempään. Myös sepsisdiagnostiikan kohdalla rutiinidiagnostiikassa hyödynnetyt NAT-testit ovat toistaiseksi harvinaisia, mutta kaupallisesti saatavien tuotteiden määrä on kuitenkin lisääntynyt viime vuosina merkittävästi (Mancini ym., 2010).

1.3 Enterokokit

Enterokokit luokiteltiin pitkään osaksi D-ryhmän streptokokkeja ja vaikka fenotyyppityksen perusteella itsenäisen *Enterococcus*-suvun taksonomista haaraa esitettiin jo aiemmin käyttöön otettavaksi (Kalina, 1970), vasta Schleiferin ja Klipper-Bälzin (1984) julkaiseman geneettisen tutkimuksen perusteella *E. faecalis* ja *E. faecium* sekä näiden alalajien muodostama *Enterococcus*-suku sai yleisen hyväksynnän tiedeyhteisössä. Sitten *Enterococcus*-sukuun on lisätty useampia lajeja. Enterokokit ovat ihmisen kannalta merkittävä ja monimuotoinen ryhmä bakteereja; joitain kantoja voidaan käyttää hyödyksi esimerkiksi ruoan valmistuksessa kun taas toiset kannat saattavat aiheuttaa vakavia infektiota. Ne kuuluvat ihmisen ruoansulatuskanavan normaaliflooraan, mutta niitä löytyy runsaasti myös maaperästä, vesistöistä sekä ruoka-aineista (Murray ym., 2007).

1.3.1 Mikrobiologiset ominaisuudet

Enterokokit ovat ovaalin muotoisia gram-positiivisia, fakultatiivisesti anaerobeja kokkeja, jotka voivat esiintyä erillisinä soluina, pareina tai ketjuina. Osa lajeista on liikuntakykyisiä osa liikuntakyvyttömiä. Ne pystyvät kasvamaan 6,5 % natriumkloridia, 40 % sappisuoloja tai 0,1 % metyleeninsinistä sisältävissä kasvuympäristöissä, 10–45°C välillä ja sietävät korkeita pH-arvoja. Useimmat enterokokit selviytyvät 60°C lämpötilassa 30 minuutin ajan. D-ryhmän streptokokkien tapaan ne kykenevät hydrolysoimaan eskuliinia sappisuolojen läsnäollessa (Chenoweth ja Schaberg. 1990). Ne kykenevät myös hydrolysoimaan pyrrolidonyyli- β -naptylamidia (PYR); ominaisuus jota käytetään hyväksi niiden biokemiallisiin kokeisiin perustuvassa tunnistamisessa (Murray, 1990). Morfologialtaan entrokokit muistuttavat gram-värjäyksessä streptokokkeja. Niiden luontainen antibioottivastustuskykyrakenne poikkeaa kuitenkin merkittävästi D-ryhmän streptokokkien vastaavasta. Enterokokkeja on 36 eri lajia, joista 26 voi aiheuttaa infektiota ihmisissä. *E. faecalis* ja *E. faecium* ovat yleisimmät ihmispatogeenit. Niiden aiheuttamien infektioiden osuus kaikista enterokokkiperäisistä infektioista ihmisissä on noin 95 %. Muita ihmispatogeeneiksi luettavia lajeja ovat mm. *E. gallinarum*, *E. casseliflavus*, *Enterococcus avium*, *Enterococcus cecorum*, *Enterococcus*

durans, *Enterococcus hirae*, *Enterococcus malodoratus*, *Enterococcus mundtii*, *Enterococcus pseudoavium* ja *Enterococcus raffinosus*. Enterokokit ovat luonnostaan vastustuskykyisiä tai vähintään tolerantteja kaikille β -laktaameille, klindamysiinille ja linkomysiinille. Lisäksi ne ovat vaihtelevasti vastustuskykyisiä eri aminoglykosidiryhmän antibiooteille (Murray, 1990).

1.3.2 Glykopeptideille vastustuskykyiset enterokokit (GRE:t)

Yksi enterokokkien kliinisesti merkittävimmistä ominaisuuksista, erityisesti *E.faecalis*- ja *E.faecium*-lajien kohdalla, on niiden voimakas taipumus kehittää vastustuskykyä antibiooteille geenimutaatioiden tai plasmidivälitteisen horisontaalisen geenisiirron avulla. (Cetinkaya ym. 2000). Enterokokit ovat yleisiä sairaalabakteereita ja aiheuttavat merkittävän osan sairaalaperäisistä virtsatietulehduksista (UTI – *urinary tract infection*) ja bakteremiatapauksista Yhdysvalloissa (Schaberg ym. 1991). Syitä niiden erityiselle selviytymiskyvylle sairaalaympäristössä ovat niiden luontainen vastustuskyky useille yleisesti käytetyille antibiooteille sekä yhä merkittävämmässä määrin niiden kyky hankkia uusia resistenssitekijöitä mutaation tai vieraan geneettisen materiaalin vastaanoton avulla (Clewell, 1990). Glykopeptidit vankomysiini ja teikoplaniini ovat olleet yleisesti käytettyjä antibiootteja jo vuosikymmenien ajan, mutta niiden käyttö on lisääntynyt merkittävästi metisilliiniresistenttien stafylokokkien ja muiden gram-positiivisten bakteerien aiheuttamien infektioiden kasvun myötä (Gold ym. 1996). Glykopeptidien laajan käytön myötä myös GRE:t ovat yhä voimakkaammin levinneet sairaalaympäristössä ja nykyisin ne ovat merkittävä tekijä sairaalaperäisten infektioiden aiheuttajana (Werner ym. 2008, Weber ja Gold, 2003).

1.3.3 Epidemiologia ja sairausassosiaatiot

Enterokokit eivät yleensä ole yhtä virulentteja kuin monet muut gram-positiiviset kokit ja ne usein esiintyvät osana monibakteriaalisia infektioita. Ne ovat osa ihmisen ruoansulatuselimistön normaaliflooraa ja yleisimmin tavattu laji terveiden ihmisten

ulostenäytteissä on *Enterococcus faecalis*, vaikkakin eri enterokokkilajien esiintyvyys ulosteissa vaihtelee suuresti eri maantieteellisten sijaintien välillä. Enterokokit kykenevät myös kolonisoimaan mm. nielua, naisten sukuelimiä sekä ihoa. Aiemmin enterokokkien infektion lähteenä pidettiin pääasiallisesti potilaan omaa normaaliflooraa ja ihmisestä ihmiseen tartuntoja havaittiin harvoin, mutta viime vuosikymmenten aikana on osoitettu selvästi, että etenkin sairaalaympäristössä yleistyneet kannat leviävät helposti ihmisestä ihmiseen. (Chenoweth ja Schaberg, 1990). Vuonna 1995 julkaistussa tutkimuksessa Patterson ym. analysoivat 110 vakavaa enterokokkipiperäistä infektiota kuudessa eri yliopistollisessa sairaalassa Connecticutissa, Yhdysvalloissa. Tutkimuksen tuloksissa todettiin, että 61 % kaikista tutkituista infektioista oli sairaalaperäisiä. Infektioiden tyypit vaihtelivat suuresti. 54 % infektioista todettiin olevan kardiovaskulaarisia, mutta myös vatsansisäisten infektioiden, munuaisinfektioiden, iho- ja pehmykudosinfektioiden, luu- ja nivelinfektioiden, hengitystieinfektioiden sekä keskushermostoinfektioiden osuudet olivat merkittäviä. Suuressa osassa kaikista infektioista todettiin myös patogeenin merkittävää vastustuskykyä antibiooteille. Tutkimuksessa analysoiduista infektiotapauksista 21 % oli polymikrobiaalisia. Näiden tapausten yhteydessä enterokokkien osuutta infektion syntyyn ja etenemiseen on vaikea arvioida.

Yleisin enterokokkien aiheuttama sairaus on bakteremia. Pattersonin ryhmän tutkimista enterokokki-infektioista 46 % edusti enterokokkipiperäistä tai polymikrobiaalista bakteremiaa. Analysoiduista bakteremiatapauksista hieman yli kolmannes edusti primääristä bakteremiaa. Muut bakteremiatapaukset olivat katetrilähtöisiä (Patterson ym., 1995). Enterokokkipiperäiseen bakteremiaan yhdistetään korkea mortaliteetti, mutta toistaiseksi ei voida sanoa liittyykö ilmiö enterokokkeihin *per se* vai johonkin piilevään sairauteen, joka usein edeltää enterokokkipiperäisen bakteremian kehittymistä (Murray, 1990).

Enterokokit aiheuttavat myös virtsatientulehduksia, etenkin sairaalapotilailla. Normaaleiksi määriteltyjen naisten keskuudessa todetuista UTI:sta yli 5 % on enterokokkipiperäisiä. Antibioottihoitoa saaneilla sekä rakenteellisista poikkavuuksista tai toistuvista UTI:sta kärsivillä yksilöillä enterokokkiprevalenssi on suurempi (Murray ym., 1990). Pattersonin ryhmän (1995) tutkimuksessa 13 % analysoiduista infektioista oli UTI:a, joista valtaosasta kehittyi urosepsis.

Endokardiitti eli sydämen sisäkalvon tulehdus on bakteremian ja virtsatientulehdusten jälkeen yleisin enterokokkipерäinen sairaus. Noin 6 % enterokokkien aiheuttamista infektioista on endokardiitteja. Useimmiten, kuten muidenkin enterokokkipерäisten sairauksien kohdalla, infektion aiheuttajana toimii *E. faecalis*. Enterokokkipерäistä endokardiittia tavataan jonkin verran lapsilla, mutta vain harvoin imeväisillä. Sitä esiintyy useammin miehillä kuin naisilla (Murray, 1990).

Enterokokkien sairausassosiaatiot ovat kaiken kaikkiaan moninaiset ja edellä on mainittu ainoastaan yleisimmät tapaukset. Esimerkiksi sen lisäksi, että enterokokit voivat aiheuttaa vastasyntyneillä meningiittiä, ne aiheuttavat jonkin verran keskushermostoinfektioita myös vanhemmilla lapsilla ja aikuisilla. Näistä tapauksista suurin osa kytkeytyy kuitenkin johonkin muuhun vallalla olevaan sairauteen (Murray, 1990).

1.3.4 Patogeneesi

Aiheuttaakseen infektion enterokokkien on kyettävä kolonisoimaan, useimmiten limakalvoja. Kolonisaation jälkeen niiden on kyettävä suojautumaan isännän puolustusmekanismeilta. Vasta em. toiminnan jälkeen ne voivat aiheuttaa patologisia muutoksia isännässä joko suoraan erittämällä biologisesti aktiivisia aineita ympäristöönsä tai vuorovaikuttamalla isännän immuunijärjestelmän kanssa (Peterson, 1996).

Enterokokkien kyky kolonisoida ihmisen ruoansulatuskanavaa perustuu niiden voimakkaaseen vuorovaikutukseen suoliston epiteelisolujen kanssa sekä niiden hyvään sietokykyyn suoliston matalien pH-arvojen suhteen (Fisher ja Phillips, 2009, Guzman ym., 1989). Enterokokkien kyky translokoitua suoliston lumenista suolilieveen imusolmukkeisiin, maksaan sekä pernaan on selkeästi osoitettu, mutta translokaation mekanismeja ei kuitenkaan tunneta tarkasti (Wells ym., 1990). Yhtenä vaihtoehtona pidetään suoliston epiteelisolujen ja makrofagien aiheuttamaa fagosytoosia, jonka avulla enterokokit leviävät isännän lymfaattiseen järjestelmään (Zeng ym., 2004). Mikäli fagosytoituja organismeja ei kyetä tuhoamaan, ne voivat päästä leviämään lymfaattisen järjestelmän kautta laajemmalle elimistöön. Infektion ylläpitämiseksi

patogeenin tulee selvitä isännän, niin spesifeiltä kuin epäspesifeiltäkin, puolustusmekanismeilta. Enterokokkien on osoitettu pystyvän, jossain määrin kantavariantista riippuen, vastustamaan fagosytoosia, mutta tarkkoja mekanismeja niiden kyvystä selviytyä ihmisen immuunijärjestelmän valvonnalta ei tunneta (Arduino ym., 1994).

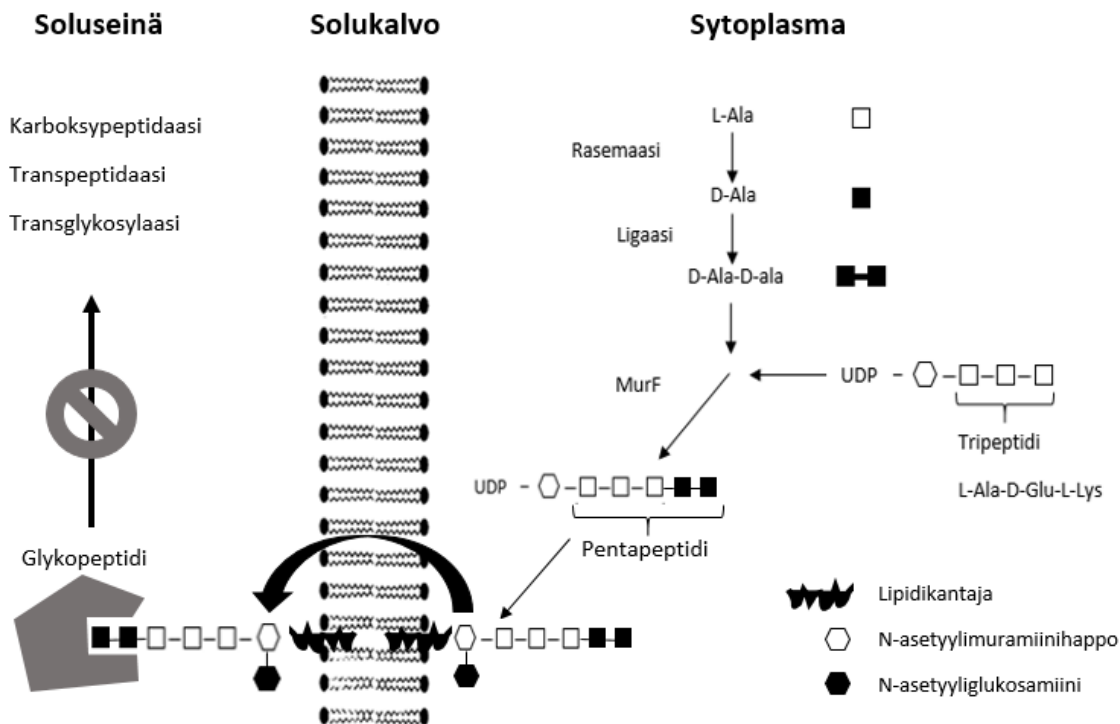
Patogeneesin viimeinen vaihe on patologisten muutosten aiheuttaminen isännässä. Enterokokkien erittämien hemolysiinin ja gelatinaasin arvellaan omalta osaltaan myötävaikuttavan infektion vakavuuteen. Hemolysiini on, paitsi kudოსvaurioita aiheuttava toksiini, myös bakteriosiini, jonka johdosta sitä voimakkaasti erittävillä *E. faecalis*-kannoilla on selkeä selektiivinen kilpailuetu moniin muihin ympäristön bakteereihin nähden. Gelatinaasi puolestaan on proteaasi, joka kykenee hydrolysoimaan gelatiinia, kollageenia, kaseiinia ja hemoglobiinia, mutta tarkkaa kuvausta sen osuudesta enterokokkien patogeneesiin ei ole. Sekä hemolysiinin että gelatinaasin voimakas positiivinen myötävaikutus bakteerin taudinaiheuttamiskykyyn on osoitettu selvästi eläinkokeilla (Chow ym., 1993, Gutchik ym., 1979), mutta vastaavaa korrelaatiosuhdetta ei ole toistettavasti tilastoitu kliinisissä tutkimuksissa, minkä vuoksi kummankin virulenssitekijän merkittävyys enterokokkien aiheuttamien, ihmisissä esiintyvien, infektioiden patogeneesissä on kiistanalainen (Upadhyaya ym., 2010, Vergis ym., 2002, Ike ym., 1987).

1.4 Glykopeptidiresistenssi

Bakteerien peptidoglykaanisynteesi on monimutkainen biokemiallinen prosessi, joka vaatii useita välivaiheita. Sytoplasmassa rasemaasi muuttaa L-alaniinin (L-ala) D-alaniiniksi (D-ala), minkä jälkeen ligaasi liittää kaksi D-alaniinia yhteen syntetisoiden D-Ala-D-Ala- dipeptidin. Tämän jälkeen D-Ala-D-Ala -dipeptidi liitetään urasiilidifosfaatti-N-asetyylimuramiini -tripeptidin päähän, jolloin muodostuu urasiili-difosfaatti-N-asetyylimuramiini -pentapeptidi. Muodostunut peptidoglykaanin esiaste kuljetetaan tämän jälkeen lipidikantajan avustuksella sytoplasmasta solukalvon ulkopinnalle. Prosessin aikana urasiilidifosfaatti-osa irtaana molekyylistä. Solun ulkopinnalla N-

asetyylimuramiini -pentapeptidi liitetään transglykosylaation avulla aiemmin aloitettuun peptidoglykaaniketjuun (Reynolds, 1989).

Glykopeptidit, kuten vankomysiini ja teikoplaniini, sitoutuvat voimakkaasti N-asetyylimuramiini- pentapeptidin C-terminaaliseen D-Ala-D-Ala -dipeptidiin ja luomansa steerisen esteen avulla estävät molekyylin liittämisen rakentumaisillaan olevaan peptidoglykaaniketjuun (Nieto ja Perkins, 1971). Glykopeptidien toimintaperiaate on esitetty kaavamaisesti kuvassa 1. Kaikki tunnetut glykopeptidiresistenssityypit perustuvat vaihtoehtoiseen proteiinisynteesiin, jossa N-asetyylimuramiini- pentapeptidin D-Ala-D-Ala -dipeptidiosa on korvattu jollain muulla, glykopeptidien kanssa heikommin vuorovaikuttavalla rakenteella. Erityyppiset glykopeptidiresistenssimekanismit eroavat kuitenkin toisistaan merkittävästi eivätkä niiden tuottamat resistenssivasteet ole yhtä voimakkaita tai säätelyltään identtisiä. Yhteensä eri glykopeptidiresistenssityyppejä on tähän mennessä määritelty kuusi: *vanA*, *vanB*, *vanC*, *vanD*, *vanE* ja *vanG*. Resistenssityypit on nimetty niiden tuottamien erilaisten ligaasi- entsyymien mukaan. Seuraavissa kappaleissa käsitellään tarkemmin resistenssityypit *vanA*, *vanB* ja *vanC*, jotka ovat toistaiseksi ainoat kliinisesti merkittävät glykopeptidivastustuskyvyn genotyypit (Courvalin, 2006).



Kuva 1. Kaavakuva peptidoglykaanin biosynteesin ja glykopeptidien välisestä vuorovaikutuksesta. Antibiootin sitoutuminen pentapeptidin C-terminaalin D-Ala-D-Ala-dipeptidiosaan estää karboksypeptidaasien, transpeptidaasien ja transglykosylaasien katalysoimien, soluseinän rakentumiselle välttämättömien, jatkoreaktioiden toteutumisen. UDP on urasiilidifosfaatti. MurF on syntetaasiproteiini. (Courvalin, 2006).

1.5.1 VanA

VanA-tyypin glykopeptidiresistenssi perustuu vaihtoehtoiseen proteiinisynteesiin, jonka tuloksena peptidoglykaanin pentapeptidi-esiasteen D-Ala-D-Ala -dipeptidi korvautuu D-alanyyli-D-laktaatti -dipeptidillä (D-Ala-D-Lac). Glykopeptidin sitouduttua pentapeptidiin, sen luoma steerinen este vaikeuttaa soluseinän rakentumisesta vastaavien entsyymien, kuten transglykosylaasien, transpeptidaasien ja D,D-karboksypeptidaasien toimintaa, mikä johtaa bakteerin soluseinäsynteesin terminaatioon (Bugg ym., 1991). Kun bakteerin soluseinäsynteesi estyy, solu havaitsee poikkeaman toistaiseksi huonosti tunnetun mekanismin avulla, jossa VanS-proteiini aiheuttaa sytoplasmisen säätelyproteiini VanR:n fosforyloitumiseen. Fosforyloitunut VanR toimii transkription aktivaattorina sitoutuen promootoreihin P_R ja P_H , jotka sijaitsevat rakenteeltaan Tn1546-transposonia muistuttavassa *vanA*-geeniryppäessä.

Seurauksena ekspressoituu kahta eri geenitranskriptiä; VanS-sensorin ja VanR-säätelytekijän synteesistä vastaava *vanRS* sekä varsinaista resistenssirypästä koodaava *vanHAXYZ* (Arthur ym., 1992).

Proteiinit VanH, VanA ja VanX vastaavat varsinaisen resistenssimekanismin eri välivaiheista. VanA-proteiini on ligaasi, joka tuottaa mekanismin kannalta välttämätöntä D-ala-D-lac -depsipeptidiä, normaalisti tuotetun D-ala-D-ala -dipeptidin sijaan. VanH-proteiini on dehydrogenaasi, joka tuottaa pyruvaatista D-laktaattia edellämainittua reaktiota varten ja vanX on D,D-dipeptidaasi, joka hajottaa enterokokin luontaisen ligaasin tuottamia D-Ala-D-ala -dipeptidejä, mutta ei vanA:n tuottamia D-Ala-D-Lac -depsipeptidejä (Reynolds ym., 1994, Arthur ym., 1991, Bugg ym., 1991). VanY on puolestaan D,D-karboksyseptidaasi, jonka toiminta vaikuttaa jossain määrin kohonneen glykopeptidivastustuskyvyn tasoon. VanZ-proteiini kytkeytyy puolestaan nimenomaan teikoplaniini-vastustuskyvyn muodostumiseen, mutta tarkkaa mekanismia ei tunneta (Cetinkaya ym., 2000).

VanA on toistaiseksi useimmin tavattu vankomysiiniresistenssin genotyyppi enterokokeilla ja sitä kantavat bakteerikannat ovat pääsääntöisesti voimakkaammin vastustuskykyisiä vankomysiinille ja etenkin teikoplaniinille kuin muiden genotyyppien kantajat (Werner ym., 2008, Cetinkaya ym., 2000).

1.5.2 *VanB*

Kuten *vanA*-resistenssi, myös *vanB*-tyypin resistenssi perustuu N-asetyylimuramiini-pentapeptidin vaihtoehtoiseen synteesiin, jossa pentapeptidin C-terminaalin dipeptidiosa D-Ala-D-Ala korvataan depsipeptidi D-Ala-D-Lac:lla (Billot-Klein ym., 1994). *VanB*-geenirypäs muistuttaa rakenteeltaan ja toiminnaltaan *vanA*-tyyppiä, mutta niiden säätelymekanismit eroavat toisistaan merkittävästi sillä *vanA*-tyypin resistenssissä sekä vankomysiini että teikoplaniini indusoivat geenirypään ekspression, mutta *vanB*-tyypin resistenssissä tämä tapahtuu ainoastaan vankomysiinin toimesta. Jos resistenssi on kuitenkin jo indusoitunut vankomysiinin toimesta, on kyseinen *vanB*-tyypin bakteerikanta vastustuskykyinen myös teikoplaniinille, ainakin siinä määrin kun resistenssimekanismin muut tekijät sen mahdollistavat (Evers ja Courvalin, 1996). *VanB*-

geeniryypästä löytyy vastine kaikille *vanA*-tyypin geeneille *vanZ*-geeniä lukuunottamatta. Lisäksi rypäs sisältää *vanW*-geenin, jonka merkitystä ei tunneta (Courvalin, 2006). Resistenssin kaksikomponenttista säätelymekanismia koodaava *vanR_BS_B* muistuttaa *vanA*-tyypin vastinettaan vain etäisesti (34 % ja 24 % DNA-sekvenssihomologia) (Evers ja Courvalin, 1996). *VanB*-resistenssejä on kolmea eri genotyyppiä, *vanB1*, *vanB2* ja *vanB3*, jotka erotellaan niiden ligaasia koodaavien *vanB*-geenien heterologisten sekvenssien perusteella. *VanB1*-, *vanB2*- ja *vanB3*-genotyyppien kesken ei ole havaittu eroja glykopeptidiresistenssin voimakkuuden suhteen (Dahl ym., 1999, Patel ym., 1998).

1.5.3 *VanC*

Kolmen eri enterokokkilajin on todettu kantavan *vanC*-tyypin glykopeptidiresistenssiä, joka *vanA*- ja *vanB*-tyypin resistensseistä poiketen ei ole siirrettävissä horisontaalisesti. *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* sekä *E. flavescens* ovat kaikki luonnostaan glykopeptidiresistenttejä ja jokaisella lajilla on niille ominainen D-alanyyli-D-seriini – dipeptidiä (D-ala-D-ser) tuottava *vanC*-ligaasi, jonka mukaan eri *vanC*-resistenssityypit on nimetty. *E. gallinarumilla* D-ala-D-ser synteesistä vastaava ligaasi on *vanC1*, *E. casseliflavusilla* *vanC2* ja *E. flavescensilla* puolestaan *van-C3* (Clark ym., 1998). *VanC2* ja *van-C3* ovat sekvensseiltään hyvin samankaltaiset ja joskus kyseiseen genotyyppiin viitataan yhdistelmällä *vanC2/C3*. Myös *vanC4*-genotyyppi on kuvattu, mutta on vielä kiistanalaista onko kyseessä oma genotyyppinsä vai vain *vanC2/C3*:n alatyypin (Watanabe ym., 2009). Myös *E. flavescensin* uudelleenkategorisoimista *E. casseliflavuksen* alatyypiksi on ehdotettu (Naser ym., 2006). *VanC*-operonin rakenne eroaa merkittävästi *vanA*- ja *vanB*-operonien vastaavasta. Varsinaisesta resistenssimekanismista eli vaihtoehtoisesta proteiinisynteesistä vastaava operonin osa koostuu kolmesta eri komponentista: VanT on D-seriiniä tuottava seriini-rasemaasi, VanC on D-ala-D-ser-dipeptidiä tuottava ligaasi ja VanXY_c on entsyymi, joka omaa sekä D,D-dipeptidaasi- että D,D-karboksyseptidaasiaktiivisuuden ja se myös sallii D-alaniiniin päättyvien peptidoglykaniesiasteiden hydrolyysin. *VanC*-tyypin kaksikomponenttista säätelyjärjestelmää koodaava geeni *vanR_cS_c* sijaitsee *vanA*:n ja *vanB*:n vastaavasta

poiketen alavirtaan resistenssigeeniryppään päättävästä *vanT*:sta. *VanC*-genotyypin enterokokit ovat luontaisesti vastustuskykyisiä vankomysiinille, mutta eivät teikoplaniinille. Lisäksi *vanC*-tyypin resistenssin ekspressio saattaa olla indusoituvaa tai jatkuvaa riippuen kannasta (Dutta ja Reynolds, 2003, Dutta ja Reynolds, 2002, Sahm ym., 1995).

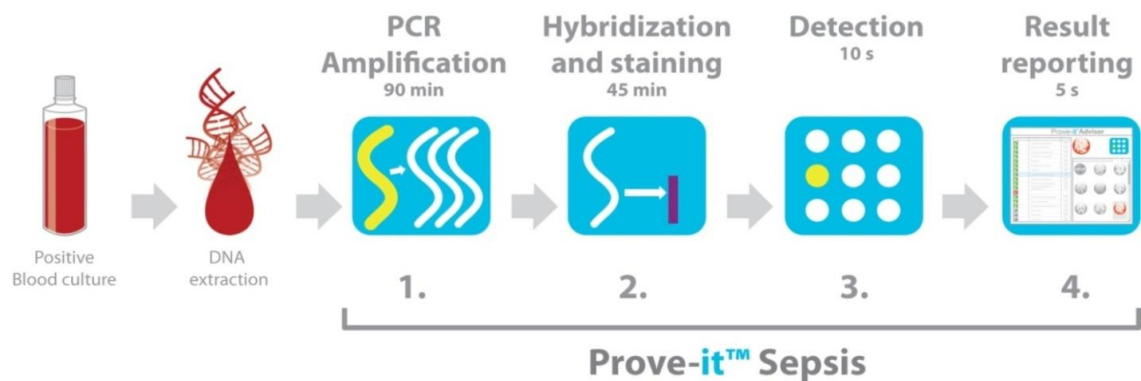
1.6 Prove-it™ Sepsis -testi

Prove-it™ Sepsis on suomalaisen Mobidiag Oy:n kehittämä sepsistä aiheuttavien bakteerilajien tunnistamiseen tarkoitettu diagnostinen testi. Lähtömateriaalina testissä käytetään positiivisesta veriviljelynäytteestä eristettyä DNA:ta. Testin tunnistamat bakteerilajit ja -ryhmät on listattu kuvassa 2. Prove-it™ Sepsiksen toiminta perustuu konservoituneiden *gyrB*- ja *parE*-geenialueiden monistukseen monikohde-PCR:n avulla ja näiden bakteerilajeille tai -ryhmille spesifisten monistustuotteiden tunnistamiseen mikrosirulla. Testillä voidaan myös tunnistaa *mecA*-geeni, jota esiintyy useilla eri stafylokokkilajeilla. Kyseinen geeni mahdollistaa vastustuskyvyn metisilliinille ja sen omaavien bakteerikantojen tunnistaminen on tärkeää erityisesti metisilliinille vastustuskykyisten *Staphylococcus aureus*- eli MRSA-infektioiden havaitsemisessa. Prove-it™ Sepsis -testin toimintaperiaate on esitetty kuvassa 3. Kesän 2008 aikana suoritetussa kliinisessä evaluaatiossa, jossa sitä verrattiin viljelyyn perustuvaan tavanomaiseen tunnistusmenetelmään, testin analyttiseksi sensitiivisyydeksi saatiin 95 % ja analyttiseksi spesifisyydeksi 99 %. MRSA:n kohdalla molemmat vastaavat luvut olivat 100 %. Prove-it™ Sepsiksen todettiin olevan keskimäärin noin 18 tuntia nopeampi kuin vertailumenetelmä (Tissari ym., 2010).

Tämä työ tehtiin osana Prove-it™ Sepsiksen tuotekehityshanketta, jonka tarkoituksena on laajentaa testin tunnistuspaneeli kattamaan *E. gallinarum*- ja *E. casseliflavus*-bakteerilajit sekä glykopeptidiantibiooteille vastustuskykyä aiheuttavat *vanA*- , *vanB1*- ja *vanB2*-geenit.

Gram+	Gram-
Identified targets	Identified targets
<i>mecA</i> methicillin resistance marker	<i>Acinetobacter baumannii</i>
<i>Clostridium perfringens</i>	<i>Enterobacter aerogenes</i>
<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>
<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Haemophilus influenzae</i>
<i>Propionibacterium acnes</i> *	<i>Kingella kingae</i> *
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Klebsiella oxytoca</i>
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
<i>Streptococcus agalactiae</i>	<i>Neisseria meningitidis</i>
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	<i>Proteus mirabilis</i>
subspecies <i>equisimilis</i>	<i>Proteus vulgaris</i>
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>Streptococcus pyogenes</i>	<i>Salmonella enterica</i> subspecies <i>enterica</i>
Coagulase negative <i>Staphylococcus</i>	<i>Serratia marcescens</i>
	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
	<i>Bacteroides fragilis</i> group
	<i>Campylobacter jejuni/coli</i>
	Enterobacteriaceae
	<i>Neisseria</i> sp. non-meningitidis
<p><i>Bacteroides fragilis</i> detects at least the following species: <i>B. fragilis</i>, <i>B. vulgatus</i>, <i>B. thetaiotaomicron</i>.</p> <p>Coagulase negative <i>Staphylococcus</i> detects at least the following species: <i>S. haemolyticus</i>, <i>S. hominis</i>, <i>S. lugdunensis</i>, <i>S. saprophyticus</i>, <i>S. warneri</i>, <i>S. xylosus</i>.</p> <p>Enterobacteriaceae detects at least the following species: <i>Citrobacter amalonaticus</i>, <i>Citrobacter braakii</i>, <i>Citrobacter freundii</i>, <i>Citrobacter koseri</i>, <i>Enterobacter hormaechei</i>, <i>Enterobacter sakazakii</i>, <i>Kluyvera intermedia</i>, <i>Morganella morganii</i>, <i>Pantoea agglomerans</i>, <i>Providencia rettgeri</i>, <i>Providencia stuartii</i>, <i>Yersinia enterocolitica</i>, <i>Yersinia pseudotuberculosis</i>.</p> <p><i>Neisseria</i> sp., non-meningitidis covers at least the following species: <i>N. gonorrhoeae</i>, <i>N. subflava</i>, <i>N. sicca</i>, <i>N. cinerea</i>, <i>N. elongata</i> subspecies <i>nitroreducens</i>, <i>N. flavescens</i>, <i>N. lactamica</i>, <i>N. zoodegmatidis</i>.</p> <p><i>Salmonella enterica</i> subspecies <i>enterica</i> detects at least the following serovars: Enteritidis, Oranienburg, Othmarschen, Panama, Paratyphi, Stanley, Typhi, Typhimurium, Virchow, group A,B,C,D.</p>	
*Available only on Prove-it™ StripArray platform.	

Kuva 2. Prove-it™ Sepsiksen tunnistamat bakteerilajit gram-väryksen mukaan jaoteltuna. Kuva on muokattu Prove-it™ Sepsis -tuotteen käyttöohjeesta. Julkaisu Mobidiag Oy:n luvalla (<http://www.mobidiag.com>).



Kuva 3. Kaavakuva Prove-it™ Sepsis -testin toiminnasta. Kuva on muokattu Prove-it™ Sepsis -tuotteen käyttöohjeesta. Julkaisu Mobidiag Oy:n luvalla (<http://www.mobidiag.com>).

1.6.1 PCR

Prove-it™ Sepsis -testissä käytetty monikohde-PCR perustuu gyraasi-entsyymiä koodaavan *gyrB*-geenialueen monistukseen. Topoisomeraaseihin kuuluva gyraasi-entsyymi tuottaa DNA-kaksoisjuosteeseen DNA-polymeraasin toiminnalle välttämättömiä negatiivisia superkierteitä katkomalla ja jälleen liittämällä DNA:ta yhteen replikaation aikana. *GyrB*-geeni sisältää useita läpi bakteerikunnan konservoituneita alueita sekä näiden väliin sijoittuvia bakteerilajikohtaisesti erikoistuneempia alueita. Konservoituneella geenialueella tarkoitetaan sellaista geenin osaa, jonka DNA-sekvenssissä ei ole lainkaan tai on vain vähän vaihtelua eri lajien välillä.

Prove-it™ Sepsiksen PCR-sovelluksessa *gyrB*-geenin monistamisessa käytetyt alukkeet on suunniteltu sitoutumaan geenin konservoituneisiin sekvenssialueisiin. Sovelluksessa käytetään useita tunnistettavan geenialueen eri vastinjuosteisiin sitoutuvia alukepareja, joiden väliin jäävä alue saadaan PCR-tekniikan perusteiden mukaisesti monistettua. Tunnistettavan geenialueen suhteen ylävirtaan sitoutuviin alukkeisiin viitataan termillä *forward* ja alavirtaan, *forward*-alukkeen sitoutumisjuosteen vastinjuosteeseen, sitoutuviin alukkeisiin termillä *reverse*. Alukkeiden sitoutumiskohtien konservoituneisuuden ansiosta voidaan minimaalisella alukemäärällä monistaa yli 60 eri bakteerin *gyrB*-geeniä n. 300 emäsparin alueelta. Monistettavan alueen väliin jää läpi

bakteerikunnan voimakasta sekvenssiheterologiaa sisältäviä alueita, joiden avulla monistettu tuote voidaan yhdistää tiettyyn bakteeriin tai joissain tapauksissa bakteerisukuun PCR-monistusta seuraavan mikrosiruhybridisaation avulla.

Prove-it™ Sepsiksen PCR-ohjelma koostuu yhdestä kolmivaiheisesta, kaksijuosteista DNA:ta tuottavasta monistuskierrosta, sekä kahdesta sitä seuraavasta kaksivaiheisesta, yksijuosteista DNA:ta tuottavasta, monistuskierrosta. Kaksijuosteisen DNA:n monistukseen tarkoitettussa vaiheessa kukin kolmesta monistusaskeleesta (kaksijuosteisen DNA:n denaturaatio, alukkeiden pariutuminen kohdesekvenssiin ja elongaatio) toistetaan 36 kertaa. Alukkeiden pariutumislämpötilana käytetään 52°C, joka on alhaisempi kun yhdenkään reaktioseoksessa käytetyn alukkeen laskennallinen T_m -arvo. Alukkeen T_m -arvolla tarkoitetaan sitä lämpötilaa, jossa puolet alukkeista on kaksijuosteisessa muodossa eli sitoutuneena templaattiin ja puolet vapaassa yksijuosteisessa muodossa. Alukkeiden pariutumislämpötilan ollessa muutaman asteen niiden sulamislämpöä korkeampi, voidaan varmistaa kaikkien alukkeiden toimivuus ja täten maksimoida reaktiossa käytettyjen alukkeiden kyky sitoutua kohdesekvenssiinsä tehokkaasti ennen elongaatiovaiheen aloitusta. Elongaatiovaiheessa reaktiossa käytettävä DNA-polymeraasi tuottaa uutta DNA:ta yksijuosteisen templaatin määräämän emäsjärjestyksen mukaisesti, templaatin kanssa pariutuneen alukkeen osoittamasta kohdasta aloittaen. Elongaatiota seuraa jälleen DNA:n denaturaatiovaihe, jossa kaikki edellisen monistuksen aikana syntyneet DNA-juosteet toimivat uuden juosteen muodostamiseen tarkoitettuna templaattina eli DNA:n määrä kasvaa jokaisen monistuskierroksen aikana eksponentiaalisesti edelliseen kierrokseen nähden, alukkeiden määrittämän alueen osalta.

Kaksijuosteista DNA:ta tuottavan 36 monistussyklin jälkeen on vuorossa kaksi peräkkäistä, yksijuosteista DNA:ta tuottavaa, kaksivaiheista monistuskiertoa. Ensimmäinen kierto koostuu aiemmin monistetun DNA:n denaturaatiosta, jota seuraa korotettu 65°C asteen pariutumislämpö, jonka aikana tapahtuu myös elongaatio. Kun kierto on toistettu viisi kertaa, korotetaan alukkeiden pariutumislämpötilaa 68°C asteeseen ja kierto toistetaan edellä mainitun kaltaisena jälleen viisi kertaa. Korotettuja pariutumislämpöjä käytettäessä *forward*-alukkeet menettävät toimintakykynsä kun taas merkittävästi korkeamman T_m -arvon omaavat *reverse*-alukkeet jatkavat pariutumista templaatin kanssa. Uutta DNA:ta syntyy siis lineaarisesti vain toisen templaatin määräämään suuntaan. Edellä kuvatun eksponentiaalisen monistusvaiheen ansiosta

kuitenkin myös yksijuosteista DNA:ta syntyy riittävästi seuraavia analyysivaiheita varten. Kukin reaktiossa käytetty *reverse*-aluke on leimattu biotiini-molekyylillä, jonka avulla reaktiossa monistetut, mikrosirun pintaan hybridisoitavat PCR-tuotteet voidaan visualisoida (Järvinen ym., 2009) (<http://www.mobidiag.com>).

1.6.2 Mikrosiruhybridisaatio

PCR:lla monistettu tuote tunnistetaan mikrosiruhybridisaation avulla. Hybridisaatiossa PCR-tuote pariutetaan emäspariperiaatetta noudattaen mikrosirulle printattujen tunnistuskoettimien kanssa. Hybridisaatioreaktion aikaansaaminen ja sen todentaminen koostuu kuudesta perättäisestä työvaiheesta: tunnistuskoettimet sisältävien mikrosirujen esipesusta, varsinaisesta hybridisaatioreaktiosta, hybridisaation jälkeisestä pesusta, konjugoinnista, konjugoinnin jälkeisestä pesusta ja hybridisaatio-konjugaatio–reaktion visualisoinnista.

Esipesun aikana mikrosirua huuhdellaan heikkosuolaisella liuoksella. Pesun tarkoituksena on liuottaa pois tunnistuskoettimia suojaava suolakerros sekä mahdolliset sirun pintaan kiinnittymättömät tunnistuskoettimet.

Hybridisaatioreaktiossa tunnistuskoettimilla pinnoitettua mikrosirua huuhdellaan reaktion kannalta optimaaliseen puskuriliuokseen sekoitetulla PCR-tuotteella, joka emäspariperiaatteen mukaisesti sitoutuu sille komplementaarisiin tunnistuskoettimiin, mikäli sellaisia sirun pinnalla on. Reaktion seurauksena sirun pintaan syntyy kaksijuosteisia nukleiinihapporakenteita, jotka on tunnistettavissa PCR-tuotteeseen sitoutuneen biotiinin avulla. Hybridisaatio suoritetaan lämpötilassa, jonka on kokeellisesti määritetty tuottavan spesifisimmän mahdollisen pariutumistuloksen. Tällöin tunnistuskoettimille ei-komplementaaristen oligonukleotidien sitoutuminen sirun pintaan on minimoitu. Hybridisaatioreaktion jälkeen mikrosirua pestään miedolla suolaliuoksella, heikosti sitoutuneen ja sitoutumattoman PCR-tuotteen poistamiseksi. Kun siru on pesty, sitä huuhdellaan konjugaattiliuoksella, joka sisältää streptavidini-molekyylin, johon on kemiallisesti liitetty HRP-entsyymi (piparjuuriperoksidaasi). Streptavidini muodostaa voimakkaan kovalenttisen sidoksen jäljelle jääneiden, spesifisen sitoutumisluonteensa johdosta voimakkaasti vuorovaikuttavien,

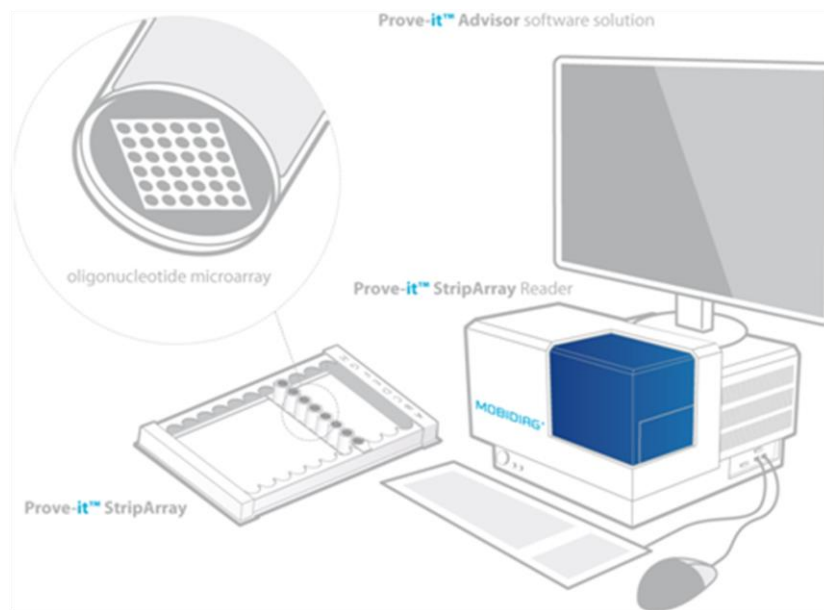
kaksijuosteisten PCR-tuote-koetin -rakenteiden biotiinin kanssa. Konjugaatiovaihetta seuraa pesu, jonka aikana sirua huuhdellaan miedolla suolaliuoksella sitoutumattomien tai heikosti sitoutuneiden konjugaattirakenteiden poistamiseksi.

Hybridisaatio-konjugaatti rakenteiden visualisoimiseksi sirua huudellaan substraattiliuoksella, joka sisältää HRP-entsyymin tetrametyylibentsidiini-substraattia. HRP-entsyymi katalysoi substraatin hapettumisreaktion, jolloin muodostuu värillinen tumma sakka. Tumma sakka muodostuu ainoastaan pisteisiin, joihin HRP-entsyymi on konjugoitunut, eli positiivisten hybridisaatioreaktioiden kohtiin. Inkubaation jälkeen tumma sakka on silmin nähden havaittavissa sirun pinnalla pieninä tummina pisteinä. Vaiheen jälkeen substraattiliuos poistetaan ja mikrosirut ovat valmiita kuvattaviksi ja analysoitaviksi (Järvinen ym., 2009) (<http://www.mobidiag.com>).

1.6.3 Tulosten analysointi ja raportointi

Hybridisaation jälkeen mikrosirut analysoidaan Prove-it™ StripArray System -järjestelmällä, joka koostuu mikrosirun kuvantamiseen tarkoitetusta kameralaitteistosta sekä siihen yhdistetystä tietokoneesta, sen lisälaitteistosta sekä varsinaisen analyysin suorittavasta Prove-it™ Advisor -ohjelmistosta (Kuva 4). Analyysiprosessin aikana Prove-it™ StripArray System:n kuvantamislaitteisto tunnistaa automaattisesti laitteiston sisälle asetetut mikrosirut, kuvaa jokaisen paikantamansa mikrosirun, jonka laitteiston käyttäjä on määrittänyt analysoitavaksi. Tämän jälkeen Prove-it™ Advisor -ohjelmisto prosessoi kuvat mitaten kunkin positiiviseen hybridisaatioreaktioon viittaavan pisteen tummuuden suhteessa sirun taustan tummuuteen. Tummuusaste on ohjelmistoon määritetty asteikolla 0-100, jossa arvo 0 tarkoittaa valkoista ja 100 mustaa väriä. Ohjelmiston hyödyntämään tietokantaan on syötetty kunkin analysoitavalle sirulle printatun tunnistuskoettimen koordinaatit, joiden avulla ohjelmisto pystyy suoraan ilmoittamaan, mille bakteerilajille spesifinen hybridisaatioreaktio on kussakin sirun kohdassa havaittu. Positiivinen hybridisaatioreaktio todennetaan vasta kun havaittu piste täyttää ohjelmistoon määritetyt morfologia-, sijainti- ja tummuusvaatimukset. Jokaisen havaitun pisteen tulee siis olla täsmällisesti sellaisessa kohdassa, jossa jonkin hybridisaatioreaktion mahdollistavan tunnistuskoettimen tiedetään sijaitsevan.

Tarkastellun pisteen tulee myös olla muodoltaan sellainen, että se on helposti tulkittavissa aidoksi hybridisaatioreaktioksi ja näin esimerkiksi sirulle ajautuneet roskat eivät valtaosassa tapauksissa pysty tuottamaan virheellisiä hybridisaatiosignaaleja. Tarkastellun pisteen tulee myös olla signaali-intensiteetiltään eli tummuusasteeltaan merkittävästi havaittua taustasignaalia voimakkaampi, jotta positiivinen hybridisaatioreaktio voidaan raportoida (Järvinen ym., 2009) (<http://www.mobidiag.com>).



Kuva 4. Prove-it™ StripArray System sekä Prove-it™ StripArray. Kuva on muokattu Prove-it™ Sepsis -tuotteen käyttöohjeesta. Julkaisu Mobidiag Oy:n luvalla (<http://www.mobidiag.com>).

2. Tutkimuksen tavoitteet ja merkitys

Tämän tutkimuksen tarkoituksena oli laajentaa sepsisdiagnoosissa käytetyn kaupallisen Prove-it™ Sepsis -tuotteen tunnistuspaneeli kattamaan yleisimmät kliinisessä ympäristössä esiintyvät glykopeptideille vastustuskykyiset enterokokit. Tutkimukseen kuului osana luontaisen glykopeptidivastustuskyvyn omaavien *E. gallinarum* ja *E. casseliflavus* tunnistamiseen hyödynnettävien tunnistuskoettimien

suunnittelu sekä glykopeptidivastustuskykyyn liittyvien horisontaalisesti siirrettävissä olevien geenien *vanA* ja *vanB* PCR-monistukseen tarkoitettujen alukkeiden ja näiden monistaman PCR-tuotteen tunnistamiseen tarkoitettujen tunnistuskoettimien suunnittelu. Edellä mainittujen geenimarkkerien oli tarkoitus täydentää testissä jo olevien enterokokkilajien tunnistusta ja toimia välineenä glykopeptidiherkkien ja glykopeptidiresistenttien *E. faecalis*- ja *E. faecium*-kantojen erottelemisessä.

Tarkoituksena oli myös arvioida suunniteltujen alukkeiden ja tunnistuskoettimien ominaisuuksia mahdollisimman laaja-alaisesti, jotta niiden käyttö rutiinidiagnostiikassa osana kaupallista testiä olisi mahdollista. Suunniteltujen oligonukleotidien arvioinnissa kiinnitettiin erityisesti huomiota niiden ristireaktio- ja herkkyystaipumuksiin, jotka ovat olennaisessa roolissa tarkkaan ja luotettavaan patogeenitunnistukseen tähdittäessä. Tutkimuksessa ei ollut kuitenkaan tarkoitus arvioida uusien tunnistusmekanismien toimivuutta kliinisellä näytemateriaalilla lopullisessa käyttöympäristössään vaan tarkoituksena oli lähinnä todentaa suunnitellun testimenetelmän periaatteiden käyttökelpoisuus mahdollisia jatkotutkimuksia, kuten kliinistä testausta, varten.

3. Aineisto ja menetelmät

3.1 Näytteet

E. gallinarum ja *E. casseliflavus* tunnistuskoettimien suunnitteluun sekä näiden toimivuuden testaamiseen käytettiin NCBI:n (*National center for biotechnology information*) tietokannasta saatuja *gyrB*-sekvenssejä sekä Mobidiag Oy:n biopankin *E. casseliflavus*- ja *E. gallinarum*-kannoista aiemmin eristettyjä DNA-näytteitä. *vanA*- ja *vanB*-geenien tunnistamiseen tarkoitettujen tunnistuskoettimien ja alukkeiden suunnitteluun käytettiin Helsingin ja Uudenmaan sairaalahoitopiirin keskuslaboratoriosta Huslabista tilattuja glykopeptidiresistenttejä *E. faecalis* ja *E. faecium*-kantoja, jotka toimitettiin Mobidiagiin maljattuina puhdasviljelminä. Kantoja toimitettiin yhteensä 17, joista kolme *vanA*-tyypin *E. faeciumia*, kaksi *vanA*-tyypin *E. faecalisia*, seitsemän *vanB*-tyypin *E. faeciumia* ja viisi *vanB*-tyypin *E. faecalisia*. *VanB1*- ja *vanB2*-genotyyppejä ei oltu eroteltu Huslabin toimesta. Puhdasviljelmistä tehtiin tuoreeltaan niiden saapumisen jälkeen DNA-eristys ja jokaisesta kannasta otettiin kaksi

pesäkettä maitoglyseroliputkiin (Liuoslaboratorio, Huslab, Helsinki). Maitoglyseroliputket laitettiin pakkaseen -80°C asteeseen mahdollista uusintakasvatusta varten. Testausvaiheen ristireaktiokokeissa käytettiin Mobidiag Oy:n referenssikannoista eristettyjä DNA-näytteitä. Aineisto koostui pääosin Prove-it™ Sepsiksen tunnistuspaneelin lajeista.

Myös lopputestaus tehtiin puhdasviljelmien avulla. Lopputestauksessa käytetyt kannat saatiin ranskalaisesta *Hôpital de bicêtre* -sairaala (Pariisi, Ranska) pistoviljelminä, joista edelleen tehtiin maljakasvatukset DNA-eristystä varten. Kustakin maljakasvatuksesta otettiin myös muutaman pesäkkeen kokoinen bakteerimassa, joka varastoitiin maitoglyseroliin -80°C asteeseen mahdollista uusintakasvatusta varten. Yhteensä pistoviljelmiä saatiin 12 kappaletta, joista kuusi oli alun perin sairaalassa potilaista eristetyistä enterokokkikannoista tehtyjä puhdasviljelmiä, neljä sairaalan mikrobiologian laboratorion käyttämiä puhdasviljelmäkontrollikantoja, yksi glykopeptideille herkkä kontrollikanta sekä yksi enterokokkien lähisukuun kuuluva *Lactococcus gergoviae* -kanta (Naas ym., 2005).

3.2 Kasvatusolosuhteet

Kaikissa kasvatuksissa alustana käytettiin veriagarmaljoja (Liuoslaboratorio, Huslab, Helsinki). Maljoja seisotettiin lämpökaapissa yön yli 37°C:ssa, aerobisissa olosuhteissa. Anaerobisia kasvatuksia ei tehty. Kasvatuksen jälkeen maljoilla havaittiin silmämääräisesti tarkasteluna identtisiä pesäkkeitä keskimäärin noin 24 tunnin kasvatuksen jälkeen, jonka jälkeen maljoilla kasvaneesta bakteerimassasta eristettiin DNA.

3.3 DNA:n eristys

DNA eristettiin puhdasviljelmistä ns. lämpöshokkimenetelmää käyttäen. Kaikista puhdasviljelmistä siirrostettiin muutaman pesäkkeen kokoinen bakteerimassa 100 µl:aan fysiologista suolaliuosta (Liuoslaboratorio, Huslab, Helsinki), jonka jälkeen liuos

sentrifugoitiin (3000 rpm, 3 min), neste poistettiin ja tilalle lisättiin 100 µl 1 x TE-puskuria (Liuoslaboratorio, Huslab, Helsinki). Seosta seisotettiin lämpöblokkissa 95°C:ssa viisi minuuttia. Emäksinen pH yhdistettynä korkeaan lämpötilaan aikaansaa bakteerisolujen hajoamisen eli lysisen. Seokseen vapautuneet hajonneiden solujen osat sentrifugoitiin korkeilla kierroksilla (13000 rpm, 10 min) koeputken pohjaan pelletiksi, soluista vapautuneen DNA:n jäädessä samanaikaisesti nestefaasiin. Liuokset otettiin talteen uusiin putkiin ja laitettiin pakkaseen odottamaan seuraavaa vaihetta. Eristyksissä käytettiin bakteerinäytteiden lisäksi pelkkää DNA-puhdasta vettä menetelmän sisäisen puhtauden kontrolloimiseksi.

3.4 Sekvensointi eli DNA:n emäsjärjestyksen selvittäminen

Ennen varsinaisten sekvensointireaktioiden tekemistä, kutakin sekvensoitavaa DNA-näytettä monistettiin PCR:n avulla kymmeniä tuhansia kertoja suurempaan kopiomäärään. Kaikkien *E. gallinarum*- ja *E. casseliflavus*-näytteiden *gyrB*-sekvensointi suoritettiin käyttäen Mobidiag Oy:ssä aiemmin suunnitelluilla, useammalle enterokokkilajille soveltuvia sekvensointialukkeita ja niille optimoitua sekvensointi-PCR-ohjelmaa käyttäen. Taulukosta 1 näkee sekvensointi-PCR:ssä käytetyn reaktioseoksen ja taulukosta 2 sekvensointi-PCR -ohjelman.

VanA-, *vanB1*- ja *vanB2*-geenien sekvensointiin käytettiin samaa PCR-ohjelmaa kuin enterokokkinäytteiden sekvensointiinkin, mutta alukkeita niiden monistamiseen ei ollut valmiina vaan sekvensointialukkeiden suunnittelu kuului osaksi tutkimustyötä. Sekvensointialukkeet suunniteltiin NCBI-tietokannasta löytyneitä *vanA*- ja *vanB*-sekvenssejä mukaillen ja niiden suunnitelemisessa hyödynnettiin Bioedit V.7.0.4 sekvenssianalysointityökalua (Ibis biosciences, USA), joka mahdollistaa suuren sekvenssijoukon samanaikaisen vertailun, sekä OligoCalc -laskentaohjelmaa (<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>), jonka avulla voidaan määrittää ohjelmaan syötetyn oligonukleotidisekvenssin ominaisuuksia, kuten sulamislämpö, guaniini-sytosiini -emäspariaste sekä potenitaalinen taipumus itsekomplementaarisuuteen. Sekvensointialukepareja suunniteltiin yhteensä kaksi: yksi pari *vanA*-geeniä monistusta varten ja yksi pari sekä *vanB1*- että *vanB2*-geenien

monistusta varten. Alukeparien toimivuus testattiin aluksi yhdellä spesifisellä näytteellä, minkä jälkeen loput näytteet sekvensoitiin. Alukkeet suunniteltiin niin, että niiden sulamislämpötila (T_m) OligoCalc-ohjelman *nearest neighbor* -laskutavan (<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>) mukaan asettui noin 6–10°C PCR-ohjelmassa käytetyn pariutumislämpötilan (44°C) yläpuolelle. Alukkeiden tarkemmat tiedot on esitetty taulukossa 3.

PCR:n ja alukkeiden toimivuus testattiin agarosigeelielektroforeesin (AGE) avulla. Agarosigeeliin lisättiin ennen sen jähmettymistä etidiumbromidia (Sigma-Aldrich GmbH, Saksa). Etidiumbromidi sitoutuu kaksijuosteiseen DNA:han ja fluoresoi UV-valossa oranssinpunaisella aallonpituudella, mikä mahdollistaa geeliin ajetun DNA:n tarkastelun visuaalisesti. PCR:llä monistetun DNA:n visualisointiin käytettiin BioRadin GelDoc laitteistoa ja siihen kuuluvaa ohjelmistoa.

AGE-ajon jälkeen PCR-tuotteet puhdistettiin niiden näytteiden osalta, joiden kohdalla todettiin riittävää spesifistä monistumista. Puhdistus suoritettiin QIAquick PCR puhdistuskitillä (Qiagen GmbH, Saksa) sen työohjeen mukaisesti. Puhdistusta seurasi sekvensointireaktioiden teko. Sekvensointireaktioon pipetoitiin 5,5 µl puhdistettua PCR-tuotetta ja 0,5 µl samaa aluketta (10 µM), jota sekvensoitavan tuotteen monistukseen oli käytetty. Yksittäiseen sekvensointireaktioon lisättiin ainoastaan joko *forward*- tai *reverse*-aluketta, jotta tuloksena saatava sekvenssi olisi mahdollisimman puhdas. Käytännössä kukin näyte sekvensoitiin sekä *forward*- että *reverse*-suuntaan sekvenssoititulosten luotettavuuden varmistamiseksi. *VanA*-, *vanB1*- ja *vanB2*-geenien kohdalla kahteen suuntaan sekvensoiminen osoittautui välttämättömäksi myös sen vuoksi, että yhteen suuntaan sekvensoidusta näytteestä saatu sekvenssi oli laadultaan tyydyttävää ainoastaan noin 600 emäsparin pituudelta alukkeen sitoutumiskohdasta monistussuuntaan päin. Sekvensoinneissa pariutumislämpötilana käytettiin 44 °C:tta, joka määritettiin käytettyjen alukkeiden sulamislämmön (T_m) mukaan. Varsinainen sekvensointi ostettiin palveluna sekvensoinnin palveluyksiköltä Haartman-instituutista (Helsingin yliopisto). Sekvensointitulokset ja niiden perusteella muodostetut emäsjärjestykset digitaalisessa muodossa saatiin suoraan sekvensointiyrityksen palvelimelta.

3.5 Sekvenssien analysointi

Sekvensointiyksikön palvelimelta ladatut sekvenssitiedostot avattiin ja tarkastettiin Vector NTI® 10 ohjelman (Life Technologies, USA) avulla. Avatut tiedostot sisälsivät ns. sekvensointikromatogrammit, joiden perusteella varsinainen sekvenssi eli emäsjärjestys oli muodostettu. Kromatogrammit tarkastettiin silmämääräisesti, jonka jälkeen sekvenssin alku- ja loppupäästä poistettiin huonolaatuiset ja epäselvät sekvenssiosuudet. Kromatogrammien muokkauksen jälkeen sekvensointitiedostot tallennettiin uudelleen ja ohjelman annettiin ryhmitellä ne automaattisesti sekvenssien samankaltaisuuden perusteella ryhmiin, jolloin kaikki samankaltaiset *forward*- ja *reverse*-suuntaiset sekvenssit ryhmittäytyivät yhteen. Kunkin ryhmän sekvenssit käytiin läpi manuaalisesti ja niistä tarkastettiin kaikki yhden emäksen poikkeamat. Mikäli valtaosa tiettyyn ryhmään sijoitetuista sekvensseistä sisälsi tarkastellun poikkeaman kohdalla tietyn emäksen ja vähemmistö samaan ryhmään sijoitetuista sekvensseistä puolestaan jonkin muun emäksen, korjattiin kyseinen poikkeama sekvensointivirheenä, sikäli kun kyseisen kohdan kromatogrammin piikin koon tai muodon tulkittiin viittaavan aidon pistemutaation sijaan teknologisista syistä johtuvaan virhetulkintaan.

Seuraavaksi tarkistuksen jälkeen muokatut ja sekvenssit linjattiin keskenään Vector NTI® 10:n AlignX-algoritmia (Life Technologies, USA) käyttäen. Linjauksen tuottamille laji- ja geenikohtaisille sekvensseille tehtiin verkkoanalyysi useita verkkotietokantoja vasten NCBI:n BLAST-työkalua (Altschul ym., 1990) (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/) käyttäen. Kaikki yli 99 % samankaltaiset sekvenssit tulkittiin luotettavasti edustavan tarkasteltua sekvenssiä ja tulosten perusteella voitiin päätellä tutkitun sekvenssin edustama geeni tai bakteerilaji. Valmiit sekvenssilinjaukset tallennettiin jatkoanalysointia ja tunnistuskoettimien suunnittelua varten. *E. casseliflavus* ja *E. gallinarum* -sekvenssejä verrattiin BLAST-algoritmin avulla myös Mobidiag Oy:n omaan sisäiseen sekvenssitietokantaan, johon on tallennettu satojen eri bakteerilajien *gyrB*-geenisekvenssejä.

Taulukko 1. *E. gallinarumin* ja *E. casseliflavus* sekvensointi-PCR:ssä käytetty reaktioseos.

Reagenssi	Valmistaja	Käyttökonsentraatio	Pipetoitava määrä 1x reaktioon (µl)
H ₂ O	Jena Bioscience (Saksa)		14,75
10x PCR -puskuri	Qiagen (Saksa)	1x	2,5
dNTP 2 mM/kutakin	Jena Bioscience (Saksa)	200 µM/kutakin	2,5
MgCl 25 mM	Jena Bioscience (Saksa)	0,5 mM	0,5
BSA 20 g/l	Euroclone (Italia)	1,25 g/l	1
<i>forward</i> -aluke (10 µM)	Metabion (Saksa)	0,4 µM	0,5
<i>reverse</i> -aluke (10 µM)	Metabion (Saksa)	0,4 µM	0,5
Polymeraasi 5U/µl	Qiagen (Saksa)	0,05 U/µl	0,25
YHTEENSÄ			22,5
DNA -templaatti			2,5

Taulukko 2. *E. gallinarumin*, *E. casseliflavus* sekä *vanA*-, *vanB1*- ja *vanB2*-geenien sekvensointi-PCR:ssä käytetty PCR-ohjelma

Lämpötila	Aika	Monistusvaiheen toistojen määrä*
95°C	15 min	1
95°C	45 s	36
44°C	45 s	36
72°C	45 s	36
72°C	10 min	1

*Kukin 36 toiston vaihe käytiin läpi ensin kerran, jonka jälkeen siirryttiin seuraavaan vaiheeseen. Näin koko kolmivaiheinen monistuskierros toistettiin 36 kertaa

Taulukko 3. *vanA*-, *vanB1*- ja *vanB2*-geenien monistamiseen suunnitellut sekvensointialukset

Nimi	Monistussuunta	Kohdegeeni(t)	Sekvenssi 5' -3' suuntaan	Pituus (emäksiä)	T _m (°C)	PCR-tuotteen pituus (bp)
vanA_sek_F_1	<i>forward</i>	<i>vanA</i>	CAATACTGTTTGGGGTTGC	20	50,14	954
vanA_sek_R_1	<i>reverse</i>	<i>vanA</i>	TACGATCAAGCGGTCAATCA	20	52,22	
vanB_sek_F_1	<i>forward</i>	<i>vanB1</i> , <i>vanB2</i>	AATCATCTTCGGCGGTTG	18	50,12	922
vanB_sek_R_1	<i>reverse</i>	<i>vanB</i> , <i>vanB2</i>	CGCCAATGTAATCAGGCTGT	20	53,38	

3.5 Tunnistuskoettimien ja alukkeiden suunnittelu

3.5.1 *E. casseliflavus* ja *E. gallinarum*

Kun sekvensoinnista saadut DNA-jaksot oli tarkastettu BLAST-algoritmin avulla, linjattiin sekvenssit yhdessä muiden Prove-it™ Sepsis -paneelin lajien *gyrB*-sekvenssien kanssa Bioedit V.7.0.4 sekvenssianalysointityökalun avulla. Linjauksista määritettiin n. 20–25 emäksen jaksoja, jotka olivat yhdenmukaisia joko kaikkien *E. gallinarum*- tai vaihtoehtoisesti kaikkien *E. casseliflavus*-sekvenssien kesken, mutta kuitenkin mahdollisimman erilaisia muihin linjauksessa käytettyihin sekvensseihin verrattaessa. Kummallekin enterokokkilajille pyrittiin löytämään mahdollisimman monta yksilöllistä sekvenssijaksoa, jonka jälkeen niiden toiminnan kannalta merkittäviä ominaisuuksia, kuten itsekomplementaarisuutta ja T_m -arvoja, tarkasteltiin OligoCalc-ohjelman avulla. Lopuksi kaikki jaksot käännettiin vastinjuosteeksi, jotta ne pariutuisivat kohdesekvenssin kanssa emäspariperiaatteen mukaisesti. Kunkin jakson sulamislämpö pyrittiin säätämään yli mikrosirulla käytetyn hybridisaatiolämpötilan (55°C). Tunnistuskoehtimen sulamislämpöä voidaan säätää esimerkiksi lyhentämällä tai pidentämällä sen pituutta. Tunnistuskoehtimet pyrittiin suunnittelemaan niin, että niiden itsekomplementaarisuus eli taipumus muodostaa kaksijuosteisia rakenteita sisäisen emäspariutumisen myötä olisi mahdollisimman vähäistä. Esimerkiksi luuppirakenteeseen taipuvien tunnistuskoehtimien kyky muodostaa kaksijuosteisia rakenteita kohdesekvenssinsä kanssa on usein heikentynyt.

Edellä mainitulla periaatteella suunniteltiin *E. gallinarumille* 7 ja *E. casseliflavusille* 9 kokeellista tunnistuskoehtinta, jotka tilattiin Mobidiag Oy:n toimittajalta ja lähetettiin edelleen alihankkijalle printattavaksi Prove-it™-mikrosiruille. Jokaista eri koehtinta printattiin mikrosiruille kahteen selkeästi erillään sijaitsevaan tarkasti määritettyyn kohtaan, jotta mahdolliset mikrosiruhybridisaatiotekniikkaan liittyvät satunnaishaitat, kuten pipetinkärjen raapaisut tai hybridisaation estävät ilmakuplat eivät estäisi tunnistuskoehtimen toiminnan tarkastelua, sillä haittojen samanaikainen ilmeneminen sirun kahdessa eri kohdassa hybridisaation aikana on epätodennäköistä.

3.5.2 *vanA*, *vanB1* ja *vanB2*-geenit

VanA-, *vanB1*- ja *vanB2*-geenien tunnistamista varten suunniteltiin sekä uusia alukepareja että näiden alukeparien monistamalle sekvenssipätkille sijoittuvia tunnistuskoehtimia. Alukeparit suunniteltiin niin, että niiden toiminta olisi optimaalista

Prove-it™ Sepsis -testissä käytettävän BioIno PCR-ohjelman kanssa. Sekvensoinnista ja NCBI-tietokannasta saaduilta geenialueilta paikannettiin ensin kaksi n. 200 emäsparin jaksoa, joiden sisältä näytti visuaalisen tarkastelun mukaan löytyvän homologisia jaksoja kohdegeenille spesifisten tunnistuskoettimien suunnittelemista varten. *VanA*-geenille paikannettiin siis kaksi vaihtoehtoista tunnistusaluetta ja *vanB1*- ja *vanB2*-geeneille kaksi vaihtoehtoista, molemmille geeneille yhteistä, tunnistusaluetta. Tutkimuksen tarkoituksena ei siis ollut suunnitella menetelmää, jolla *vanB1*- tai *vanB2*-geenin omaavia enterokokkikantoja voitaisiin erotella toisistaan. Kun kummallekin tunnistettavalle geenille oli määritetty vaihtoehtoiset tunnistusalueet, suunniteltiin kullekin tunnistusalueelle alukkeet Prove-it™ Sepsis -testin PCR-periaatteiden mukaisesti eli niin, että *forward*- ja *reverse*-alukkeiden T_m arvot poikkesivat toisistaan huomattavasti. *Forward*-alukkeiden laskennalliset T_m -arvot pyrittiin optimoimaan 56 °C —60 °C välille (4—8°C korkeampi kuin kolmivaiheisen monistussyklin aikana käytetty pariutumislämpö) ja *reverse*-alukkeiden laskennalliset T_m -arvot pyrittiin optimoimaan välille 65°C—70°C (kaksivaiheisten monistussykliin pariutumislämpötilat 65 °C ja 68 °C). Muuten alukkeet suunniteltiin samoja ohjelmia käyttäen ja periaatteita noudattaen kuin edellisessä kappaleessa kuvatut tunnistuskoettimetkin. *VanA*-geenin ensimmäiselle vaihtoehtoiselle tunnistusalueelle (tunnistusalue *vanA_1.0*) suunniteltiin yhteensä kaksi *forward*- ja kaksi *reverse*-aluketta ja toiselle vaihtoehtoiselle tunnistusalueelle (tunnistusalue *vanA_3.0*) puolestaan kaksi *forward*-aluketta ja yksi *reverse*-aluke. *VanB*-geenien geneeriseen tunnistukseen paikannetulle ensimmäiselle vaihtoehtoiselle tunnistusalueelle (tunnistusalue *vanB_1.0*) suunniteltiin yhteensä kaksi *forward*- ja kaksi *reverse*-aluketta ja toiselle vaihtoehtoiselle tunnistusalueelle (tunnistusalue *vanB_2.0*) kaksi *forward*- ja neljä *reverse*-aluketta. *VanA*-, *vanB1*- ja *vanB2*-geenien tunnistuskoettimet suunniteltiin samojen periaatteiden mukaisesti kuin *E. gallinarum*- ja *E. casseliflavus*-tunnistuskoettimet. *VanA*:lle spesifejä tunnistuskoettimia suunniteltiin yhteensä 12, kuusi kummallekin vaihtoehtoiselle tunnistusalueelle ja sekä *vanB1*- että *vanB2*-geenille spesifejä tunnistuskoettimia suunniteltiin yhteensä 11, viisi tunnistusalueelle 1.0 ja kuusi tunnistusalueelle 2.0. Tuotannollisteknisistä syistä ainoastaan osaa suunnitelluista tunnistuskoettimista printattiin kahteen eri kohtaan mikrosirua.

3.6 Testausmenetelmät

Suunniteltujen tunnistuskoettimien testaamisessa käytettiin kaikille näytteille Prove-it™ Sepsis-testin ohjetta (Mobidiag Oy, Suomi). Testattujen näytteiden kaikille suunnitelluille tunnistuskoettimille tuottamat suhteelliset signaali-intensiteetit kirjattiin ylös Microsoft® Office Exceliin (Microsoft Inc., USA), jossa jokaisen tunnistuskoettimen kahden duplikaatin antamasta signaali-intensiteetistä laskettiin aritmeettinen keskiarvo. Keskiarvojen avulla kaikista tunnistuskoettimesta piirrettiin pylväsdiagrammit. Pylväsdiagrammien perusteella havaittiin kunkin kokeen kysymyksenasetteluun nähden parhaiten toimivat tunnistuskoettimet.

Aritmeettinen keskiarvo laskettiin käyttäen kaavaa:

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i = \frac{(x_1 + \dots + x_n)}{n},$$

jossa n on havaintojen lukumäärä.

Alukkeiden toimintaa testattiin aluksi AGE:n avulla. Mikäli tietty alukepari näytti AGE-ajon perusteella monistavan jotain oikean kokoista tuotetta, testattiin alukeparin yksijuosteisen DNA:n monistamiskyky hybridisoimalla kyseinen PCR-tuote mikrosirulle, johon monistusalueelle spesifit tunnistuskoettimet oli printattu. Resistenssigeenejä *vanA*, *vanB1* ja *vanB2* monistavien alukkeiden toimivuuden testauksessa käytetty PCR-reaktioseos on esitetty taulukossa 4 ja PCR-ohjelma taulukossa 5.

Signaali-intensiteetti- ja ristireaktiokokeiden tulosten perusteella oli tarkoitus eliminoida alukkeet ja tunnistuskoettimet, joiden toiminnassa havaittiin taipumuksia epäherkkyyteen tai epäspesifisyyteen. Vankomysiiniresistenssin osalta oli tarkoitus myös määrittää sekä *vanA*- että *vanB*-genotyyppien tunnistamiseen parhaiten soveltuva vaihtoehtoinen tunnistusalue. Valintakriteereinä olivat mahdollisimman suuren herkkyyden ohella minimaalinen ristireaktiotaipumus. Herkkyytestauksissa valittiin yksi näyte kutakin testattavaa kohdelajia, joiden DNA-konsentraatio määritettiin spektrofotometrillä (Eppendorf Biophotometer, Saksa) A_{260} -mittausta käyttäen. Glykopeptidiresistenssin osalta kohdelajiksi katsottiin kaikki ne *E. faecalis* ja *E. faecium*-kannat, joiden tiedettiin omaavan *vanA*-, *vanB1*- tai *vanB2*-geenin. Positiiviseksi tulokseksi katsottiin sekä resistenssigeenin että sitä kantavan enterokokkilajin

samanaikainen tunnistus. Kaikille näytteelle tehtiin kaksi mittausta, joiden tuloksista laskettiin aritmeettinen keskiarvo mittausvirheen minimoimiseksi. Kaikista näytteestä tehtiin laimennossarja veteen. Laimennossarjat on esitelty taulukossa 6. Tunnistetun näytteen DNA-pitoisuuden ja tunnettujen genomikokojen perusteella muutettiin näytteiden sisältämä DNA-määrä genomiekvivalenteiksi käyttäen kaavaa:

$$\text{Bakteerigenomin koko (g)} = \frac{x \times 654,54 \frac{\text{g}}{\text{mol}}}{N_A},$$

missä x on bakteerin genomin koko emäspareina, N_A on avogadron vakio eli $6,022 \cdot 10^{23}$ hiukkasta/mol ja 654,54 g/mol yhden emäsparin keskimääräinen moolimassa.

Bakteerigenomin koot emäspareina laskettuna määritettiin NCBI:n Genome-tietokannan kullekin lajille ilmoittaman bakteerin referenssikannan mukaan (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome>). Herkkyytestauksissa käytetty PCR-reaktioseos on esitetty taulukossa 7.

Taulukko 4. *vanA*-, *vanB1*- ja *vanB2*-geenien monistamiseen tarkoitettujen alukkeiden testauksessa käytetty PCR-reaktioseos.

Reagenssi	Käyttökonsentraatio	Pipetoitava määrä 1x reaktioon (μl)
H ₂ O		5,65
10x PCR -puskuri	1x	1,5
BSA 20 g/l	1,5 g/l	1,125
MgCl 25 mM	0.5 mM	0,3
dNTP 2 mM/kutakin	300 μM/kutakin	2,25
<i>forward</i> -aluke (10 μM)	0,1 μM	0,15
<i>reverse</i> -aluke (10 μM)	0,1 μM	0,15
Polymeraasi 5 U/μl	0,125 U/μl	0,375
Prove-it™ Sepsis PCR -kontrolli	Ei tiedossa*	2
YHTEENSÄ		13,5
DNA templaatti		1,5

*Kaikkien Prove-it™ Sepsis -tuotteessa käytettävien kaupallisten reagenssien pitoisuuksia ei ollut saatavilla.

Taulukko 5. *vanA*-, *vanB1*- ja *vanB2*-geenien monistamiseen tarkoitettujen alukkeiden testauksessa käytetty PCR-ohjelma

Lämpötila	Aika	Monistusvaiheen toistojen määrä*
95°C	15 min	1
96°C	10 s	36
52°C	35 s	36
72°C	10 s	36
96°C	5 s	5
65°C	30 s	5
96°C	5 s	5
68°C	30 s	5

*Kukin 36 toiston vaihe käytiin läpi ensin kerran, jonka jälkeen siirryttiin seuraavaan vaiheeseen. Näin koko kolmivaiheinen monistuskierto toistettiin 36 kertaa. Kun em. kierto oli toistettu 36 kertaa siirryttiin seuraavaan kiertoon 96°C ja 65°C välille, joka käytiin samaan tapaan läpi viisi kertaa ennen kuin siirryttiin viimeiseen vaiheeseen 96°C ja 68°C välille. Tämä kierto toistettiin edellisen tapaan myös viisi kertaa

Taulukko 6. Herkkyytestauksissa käytettyjen laimennossarjojen tiedot ja DNA-konsentraatiot genomiekvivalenteiksi muunnettuna.

Näytetunnus	Bakteerilaji	Glykopeptidiresistenssityyppi	Näytteen DNA-pitoisuus (pg/μl)	DNA:n määrä PCR-reaktiossa	Genomin koko (bp)	Genomiekvivalentteja
Dn4434	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	vanC2	333	500 pg	3445000	133531,9949
Dn4434	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	vanC2	33,3	50 pg	3445000	13353,19949
Dn4434	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	vanC2	3,33	5 pg	3445000	1335,319949
Dn4434	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	vanC2	0,333	500 fg	3445000	133,5319949
Dn4429	<i>Enterococcus gallinarum</i>	vanC1	333	500 pg	3130000	146970,5183
Dn4429	<i>Enterococcus gallinarum</i>	vanC1	33,3	50 pg	3130000	14697,05183
Dn4429	<i>Enterococcus gallinarum</i>	vanC1	3,33	5 pg	3130000	1469,705183
Dn4429	<i>Enterococcus gallinarum</i>	vanC1	0,333	500 fg	3130000	146,9705183
Dn4427	<i>Enterococcus faecalis</i>	vanA	333	500 pg	3360000	136910,0364
Dn4427	<i>Enterococcus faecalis</i>	vanA	33,3	50 pg	3360000	13691,00364
Dn4427	<i>Enterococcus faecalis</i>	vanA	3,33	5 pg	3360000	1369,100364
Dn4427	<i>Enterococcus faecalis</i>	vanA	0,333	500 fg	3360000	136,9100364
Dn4422	<i>Enterococcus faecalis</i>	vanB1	333	500 pg	3360000	136910,0364
Dn4422	<i>Enterococcus faecalis</i>	vanB1	33,3	50 pg	3360000	13691,00364
Dn4422	<i>Enterococcus faecalis</i>	vanB1	3,33	5 pg	3360000	1369,100364
Dn4422	<i>Enterococcus faecalis</i>	vanB1	0,333	500 fg	3360000	136,9100364
Dn4425	<i>Enterococcus faecalis</i>	vanB2	333	500 pg	3360000	136910,0364
Dn4425	<i>Enterococcus faecalis</i>	vanB2	33,3	50 pg	3360000	13691,00364
Dn4425	<i>Enterococcus faecalis</i>	vanB2	3,33	5 pg	3360000	1369,100364
Dn4425	<i>Enterococcus faecalis</i>	vanB2	0,333	500 fg	3360000	136,9100364
Dn4420	<i>Enterococcus faecium</i>	vanA	333	500 pg	3070000	149842,9063
Dn4420	<i>Enterococcus faecium</i>	vanA	33,3	50 pg	3070000	14984,29063
Dn4420	<i>Enterococcus faecium</i>	vanA	3,33	5 pg	3070000	1498,429063
Dn4420	<i>Enterococcus faecium</i>	vanA	0,333	500 fg	3070000	149,8429063
Dn4416	<i>Enterococcus faecium</i>	vanB1	333	500 pg	3070000	149842,9063
Dn4416	<i>Enterococcus faecium</i>	vanB1	33,3	50 pg	3070000	14984,29063
Dn4416	<i>Enterococcus faecium</i>	vanB1	3,33	5 pg	3070000	1498,429063
Dn4416	<i>Enterococcus faecium</i>	vanB1	0,333	500 fg	3070000	149,8429063
Dn4418	<i>Enterococcus faecium</i>	vanB2	333	500 pg	3070000	149842,9063
Dn4418	<i>Enterococcus faecium</i>	vanB2	33,3	50 pg	3070000	14984,29063
Dn4418	<i>Enterococcus faecium</i>	vanB2	3,33	5 pg	3070000	1498,429063
Dn4418	<i>Enterococcus faecium</i>	vanB2	0,333	500 fg	3070000	149,8429063

Taulukko 7. *vanA*-, *vanB1*- ja *vanB2*-geenien herkkyystestauksissa käytetty PCR – reaktioseos.

Reagenssi	Käyttökonsentraatio	Pipetoitava määrä 1x reaktioon (µl)
H ₂ O		3,7735
10x PCR -puskuri	1x	1,5
BSA 20 g/l	1,5 g/l	1,125
MgCl 25 mM	0.5 mM	0,3
dNTP 2 mM/kutakin	300 µM/kutakin	2,25
Prove-it™ Sepsis <i>reverse</i> -alukeseos	Ei tiedossa*	0,8925
Prove-it™ Sepsis <i>forward</i> -alukeseos	Ei tiedossa*	0,684
<i>vanA_F_3.2</i> (10 µM)	0,1 µM	0,15
<i>vanA_F_3.1</i> (10 µM)	0,1 µM	0,15
<i>vanB_F_2.1</i> (10 µM)	0,1 µM	0,15
<i>vanB_R_2.1</i> (10 µM)	0,1 µM	0,15
Polymeraasi 5 U/µl	0,125 U/µl	0,375
Prove-it™ Sepsis PCR -kontrolli	Ei tiedossa*	2
YHTEENSÄ		13,5
DNA templaatti		1,5

*Kaikkien Prove-it™ Sepsis -tuotteessa käytettävien kaupallisten reagenssien pitoisuuksia ei ollut saatavilla.

4. Tulokset

4.1 Suunnitellut alukkeet ja tunnistuskoettimet

Sekvenssilinjausten perusteella suunniteltiin *E. casseliflavusille* 9 ja *E. gallinarumille* 7 tunnistuskoetinta, jotka on esitelty yksityiskohtaisesti taulukossa 8. Taulukossa 9 on esitelty yksityiskohtaisesti *vanA*-, *vanB1*- ja *vanB2*-geeneille suunnitellut tunnistuskoettimet ja taulukossa 10 kyseisten geenien tunnistusalueiden monistamiseen suunnitellut alukkeet.

Taulukko 8. *E. gallinarum*ille ja *E. casseliflavus*ille suunnitellut tunnistuskoettimet ja niiden tärkeimmät ominaisuudet. Tunnistuskoettimien sekvenssit ovat Mobidiag Oy:n omaisuutta eikä niitä voida julkaista tässä tutkimuksessa

Kohdelaji	Nimi	Kohdegeeni	Pituus (emäksiä)	GC-pitoisuus (%)	T _m (°C)
<i>Enterococcus casseliflavus</i>	E_cas_1	<i>gyrB</i>	23	52	59,57
<i>Enterococcus casseliflavus</i>	E_cas_2	<i>gyrB</i>	23	57	59,1
<i>Enterococcus casseliflavus</i>	E_cas_3	<i>gyrB</i>	26	46	60,15
<i>Enterococcus casseliflavus</i>	E_cas_4	<i>gyrB</i>	27	48	62,07
<i>Enterococcus casseliflavus</i>	E_cas_5	<i>gyrB</i>	21	62	59,24
<i>Enterococcus casseliflavus</i>	E_cas_6	<i>gyrB</i>	22	64	59,72
<i>Enterococcus casseliflavus</i>	E_cas_7	<i>gyrB</i>	27	48	59,46
<i>Enterococcus casseliflavus</i>	E_cas_8	<i>gyrB</i>	26	50	59,71
<i>Enterococcus casseliflavus</i>	E_cas_9	<i>gyrB</i>	20	70	59,76
<i>Enterococcus gallinarum</i>	E_gal_1	<i>gyrB</i>	24	54	61,28
<i>Enterococcus gallinarum</i>	E_gal_2	<i>gyrB</i>	24	58	59,63
<i>Enterococcus gallinarum</i>	E_gal_3	<i>gyrB</i>	28	43	60,11
<i>Enterococcus gallinarum</i>	E_gal_4	<i>gyrB</i>	23	57	59,85
<i>Enterococcus gallinarum</i>	E_gal_6	<i>gyrB</i>	27	44	58,14
<i>Enterococcus gallinarum</i>	E_gal_7	<i>gyrB</i>	24	58	60,68
<i>Enterococcus gallinarum</i>	E_gal_8	<i>gyrB</i>	25	44	59,1

Taulukko 9. *vanA*-, *vanB1*- ja *vanB2*-geeneille suunnitellut tunnistuskoettimet ja niiden tärkeimmät ominaisuudet. Tunnistuskoettimien sekvenssit ovat Mobidiag Oy:n omaisuutta eikä niitä voida julkaista tässä tutkimuksessa

Kohdegeeni	Tunnistusalue	Nimi	Pituus (emäksiä)	GC -pitoisuus (%)	T _m (°C)
<i>vanA</i>	<i>vanA</i> 1.0	<i>vanA</i> _1.1	24	50	59,88
<i>vanA</i>	<i>vanA</i> 1.0	<i>vanA</i> _1.2	22	59	60,71
<i>vanA</i>	<i>vanA</i> 1.0	<i>vanA</i> _1.3	24	58	61,07
<i>vanA</i>	<i>vanA</i> 1.0	<i>vanA</i> _1.4	22	55	59,72
<i>vanA</i>	<i>vanA</i> 1.0	<i>vanA</i> _1.5	25	52	59,27
<i>vanA</i>	<i>vanA</i> 1.0	<i>vanA</i> _1.6	28	43	58,72
<i>vanA</i>	<i>vanA</i> 3.0	<i>vanA</i> _3.1	25	48	59,17
<i>vanA</i>	<i>vanA</i> 3.0	<i>vanA</i> _3.2	22	59	60,24
<i>vanA</i>	<i>vanA</i> 3.0	<i>vanA</i> _3.3	28	43	59,06
<i>vanA</i>	<i>vanA</i> 3.0	<i>vanA</i> _3.4	22	59	59,08
<i>vanA</i>	<i>vanA</i> 3.0	<i>vanA</i> _3.5	26	46	59,01
<i>vanA</i>	<i>vanA</i> 3.0	<i>vanA</i> _3.6	26	46	58,16
<i>vanB1/vanB2</i>	<i>vanB</i> 1.0	<i>vanB</i> _1.1	26	46	60,37
<i>vanB1/vanB2</i>	<i>vanB</i> 1.0	<i>vanB</i> _1.2	24	50	57,73
<i>vanB1/vanB2</i>	<i>vanB</i> 1.0	<i>vanB</i> _1.3	25	44	58,7
<i>vanB1/vanB2</i>	<i>vanB</i> 1.0	<i>vanB</i> _1.4	23	57	58,31
<i>vanB1/vanB2</i>	<i>vanB</i> 1.0	<i>vanB</i> _1.5	24	50	60,92
<i>vanB1/vanB2</i>	<i>vanB</i> 2.0	<i>vanB</i> _2.1	25	40	57,51
<i>vanB1/vanB2</i>	<i>vanB</i> 2.0	<i>vanB</i> _2.2	23	52	58,77
<i>vanB1/vanB2</i>	<i>vanB</i> 2.0	<i>vanB</i> _2.3	23	57	60,31
<i>vanB1/vanB2</i>	<i>vanB</i> 2.0	<i>vanB</i> _2.4	23	57	60,47
<i>vanB1/vanB2</i>	<i>vanB</i> 2.0	<i>vanB</i> _2.5	25	52	59,12
<i>vanB1/vanB2</i>	<i>vanB</i> 2.0	<i>vanB</i> _2.6	26	50	59,15

Taulukko 10. *vanA*-, *vanB1*- ja *vanB2*-geenien monistamiseen suunnitellut alukkeet niiden tärkeimmät ominaisuudet. Alukkeiden sekvenssit ovat Mobidiag Oy:n omaisuutta eikä niitä voida julkaista tässä tutkimuksessa

Nimi	Monistussuunta	Kohdegeeni	Tunnistusalue	Pituus (emäksiä)	GC -pitoisuus (%)	T _m (°C)
vanA_F_1.1	<i>forward</i>	<i>vanA</i>	vanA_1.0	25	44	56,46
vanA_R_1.1	<i>reverse</i>	<i>vanA</i>	vanA_1.0	32	59	68,77
vanA_F_1.2	<i>forward</i>	<i>vanA</i>	vanA_1.0	26	42	57,22
vanA_R_1.2	<i>reverse</i>	<i>vanA</i>	vanA_1.0	33	52	66,51
vanA_F_3.1	<i>forward</i>	<i>vanA</i>	vanA_3.0	27	41	58,73
vanA_R_3.1	<i>reverse</i>	<i>vanA</i>	vanA_3.0	26	42	58,34
vanA_R_3.1	<i>reverse</i>	<i>vanA</i>	vanA_3.0	35	51	69,11
vanA_F_3.2	<i>forward</i>	<i>vanA</i>	vanA_3.0	22	55	58,31
vanB_R_1.1	<i>reverse</i>	<i>vanB</i>	vanB_1.0	33	64	69,53
vanB_F_1.2	<i>forward</i>	<i>vanB</i>	vanB_1.0	24	50	58,4
vanB_R_1.2	<i>reverse</i>	<i>vanB</i>	vanB_1.0	32	63	70,08
vanB_F_2.1	<i>forward</i>	<i>vanB</i>	vanB_2.0	26	46	58,77
vanB_R_2.1	<i>reverse</i>	<i>vanB</i>	vanB_2.0	26	46	59,77
vanB_F_2.2	<i>forward</i>	<i>vanB</i>	vanB_2.0	33	45	64,88
vanB_R_2.2	<i>reverse</i>	<i>vanB</i>	vanB_2.0	33	42	63,67
vanB_R_2.3	<i>reverse</i>	<i>vanB</i>	vanB_2.0	26	65	67,35
vanB_R_2.3	<i>reverse</i>	<i>vanB</i>	vanB_2.0	32	56	67,52

4.2 *vanA*-, *vanB1*- ja *vanB2*-geenien tunnistamiseen tarkoitettujen alukkeiden ja tunnistuskoettimien testaus

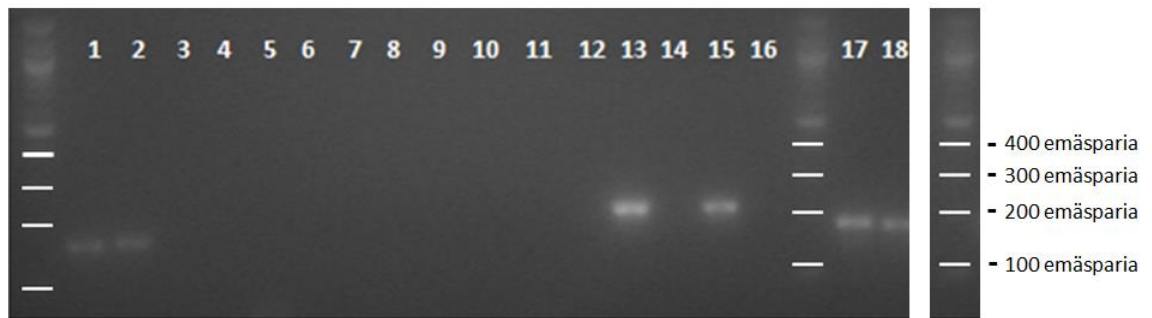
4.2.1 Parhaiden alukkeiden ja tunnistuskoettimien valinta

Kaikista suunnitelluista alukkeista testattiin kaikki potentiaalisesti toimivat alukeparit niin, että jokainen tietyllä tunnistusalueella suunniteltu *forward*-aluke testattiin jokaisen samalle tunnistusalueelle suunnitellun *reverse*-alukkeen kanssa. Yhteensä alukepareja testattiin 18, joista neljä tunnistusalueelle *vanB* 1.0, kahdeksan tunnistusalueelle *vanB* 2.0, neljä tunnistusalueelle *vanA* 1.0 ja kaksi tunnistusalueelle *vanA* 3.0. Kukin alukepari monisti noin 200 emäsparin kokoista tuotetta. Testatut alukeparit on esitelty taulukossa 11. Kunkin alukeparin kohdalla käytetty PCR-

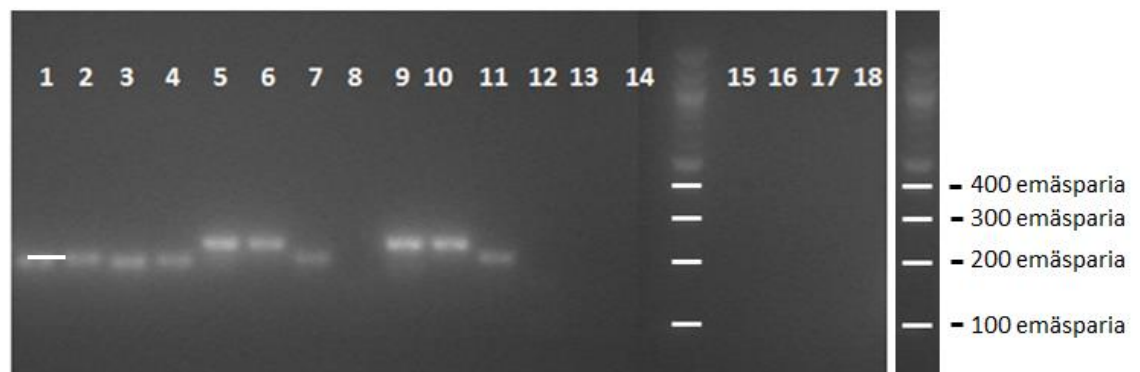
reaktioseos on esitelty taulukossa 4 ja talukossa 5 on esitelty testeissä käytetty PCR-ohjelma. Kuvissa 4–6 on esitelty kullakin alukeparilla monistuneet tuotteet AGE:lla tarkasteltuina, kun näytteinä on käytetty kolmea eri *E. faecium*-kantaa; *vanA*-, *vanB1*- ja *vanB2*-positiivisia. Kuvissa 4–6 esiteltyjen AGE-tulosten perustella valittiin alukepareista parhaiten oikean kokoista tuotetta (n. 200 emäsparia alukeparista riippuen) vain kohdenäytteestään monistavat ja näiden alukeparien osalta testattiin mikrosiruhybridisaation avulla niiden yksijuosteisen kohde-DNA:n monistuskyyky. Samalla testattiin suunniteltujen tunnistuskoettimien toimivuus signaali-intensiteettikokeiden avulla. Mikrosiruhybridisaation tulokset on esitelty kuvissa 7-10. Pylväsdiagrammeissa ei ole huomioitu alle 25 yksikön intensiteettejä, joka on hieman alle Prove-it™ Advisor -ohjelmiston käyttämän taustaintensiteetin raja-arvon.

Taulukko 11. Testatut alukeparit *vanA*- ja *vanB*-geenien tunnistamiseen

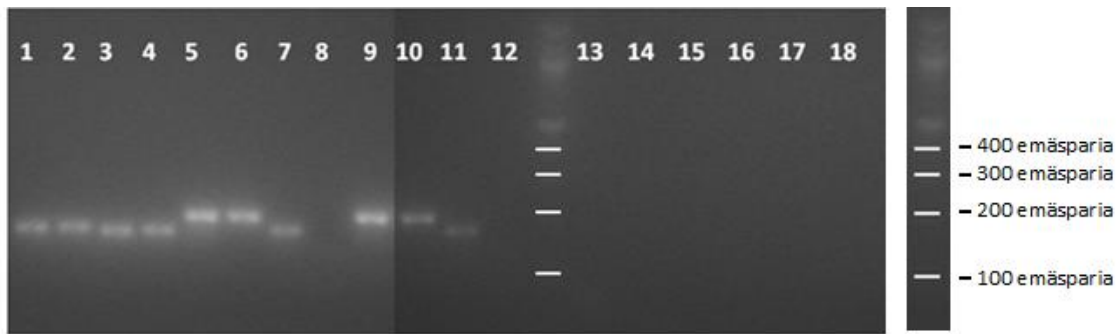
Nimi	<i>forward</i> -aluke	<i>reverse</i> -aluke	Kohdegeeni	Monistettava tunnistusalue
Alukepari 1	vanB_F_1.1	vanB_R_1.1	<i>vanB</i>	vanB 1.0
Alukepari 2	vanB_F_1.1	vanB_R_1.2	<i>vanB</i>	vanB 1.0
Alukepari 3	vanB_F_1.2	vanB_R_1.1	<i>vanB</i>	vanB 1.0
Alukepari 4	vanB_F_1.2	vanB_R_1.2	<i>vanB</i>	vanB 1.0
Alukepari 5	vanB_F_2.1	vanB_R_2.1	<i>vanB</i>	vanB 2.0
Alukepari 6	vanB_F_2.1	vanB_R_2.2	<i>vanB</i>	vanB 2.0
Alukepari 7	vanB_F_2.1	vanB_R_2.3	<i>vanB</i>	vanB 2.0
Alukepari 8	vanB_F_2.1	vanB_R_2.4	<i>vanB</i>	vanB 2.0
Alukepari 9	vanB_F_2.2	vanB_R_2.1	<i>vanB</i>	vanB 2.0
Alukepari 10	vanB_F_2.2	vanB_R_2.2	<i>vanB</i>	vanB 2.0
Alukepari 11	vanB_F_2.2	vanB_R_2.3	<i>vanB</i>	vanB 2.0
Alukepari 12	vanB_F_2.2	vanB_R_2.4	<i>vanB</i>	vanB 2.0
Alukepari 13	vanA_F_1.1	vanA_R_1.1	<i>vanA</i>	vanA 1.0
Alukepari 14	vanA_F_1.1	vanA_R_1.2	<i>vanA</i>	vanA 1.0
Alukepari 15	vanA_F_1.2	vanA_R_1.1	<i>vanA</i>	vanA 1.0
Alukepari 16	vanA_F_1.2	vanA_R_1.2	<i>vanA</i>	vanA 1.0
Alukepari 17	vanA_F_3.1	vanA_R_3.1	<i>vanA</i>	vanA 3.0
Alukepari 18	vanA_F_3.2	vanA_R_3.1	<i>vanA</i>	vanA 3.0



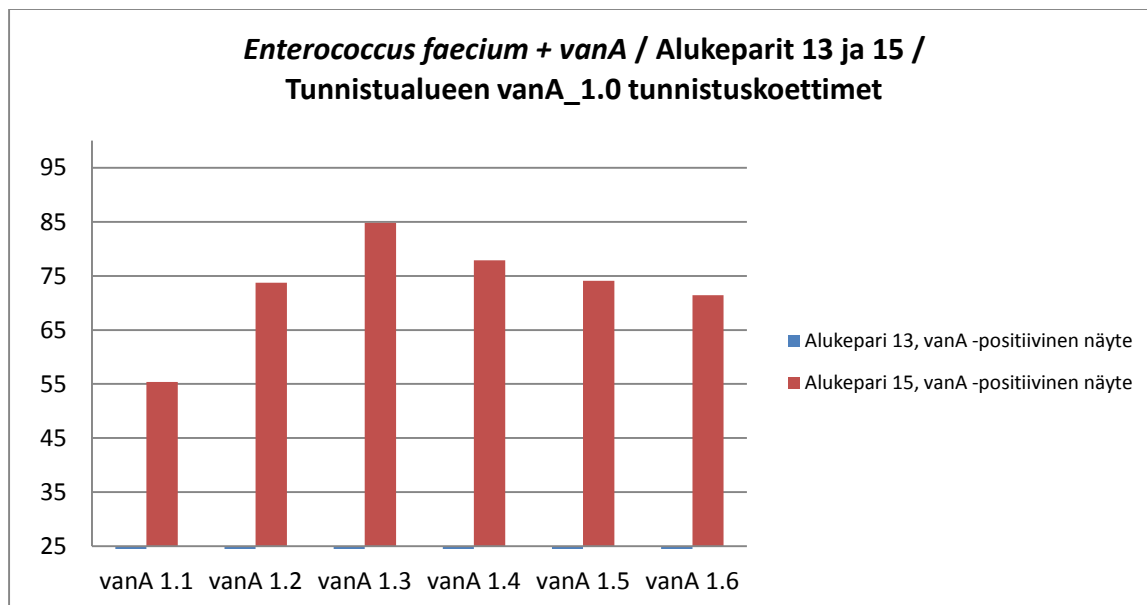
Kuva 4. Taulukossa 11 esiteltyjen alukeparien monistustuotteet AGE:lla tarkasteltuna kun näytteenä on käytetty *vanA*-tyypin resistenssin omaavaa *E. faecium*-kantaa. Alukeparit 1-12 ovat *vanB*-geenien monistukseen ja alukeparit 13–18 *vanA*-geenin monistukseen suunniteltuja.



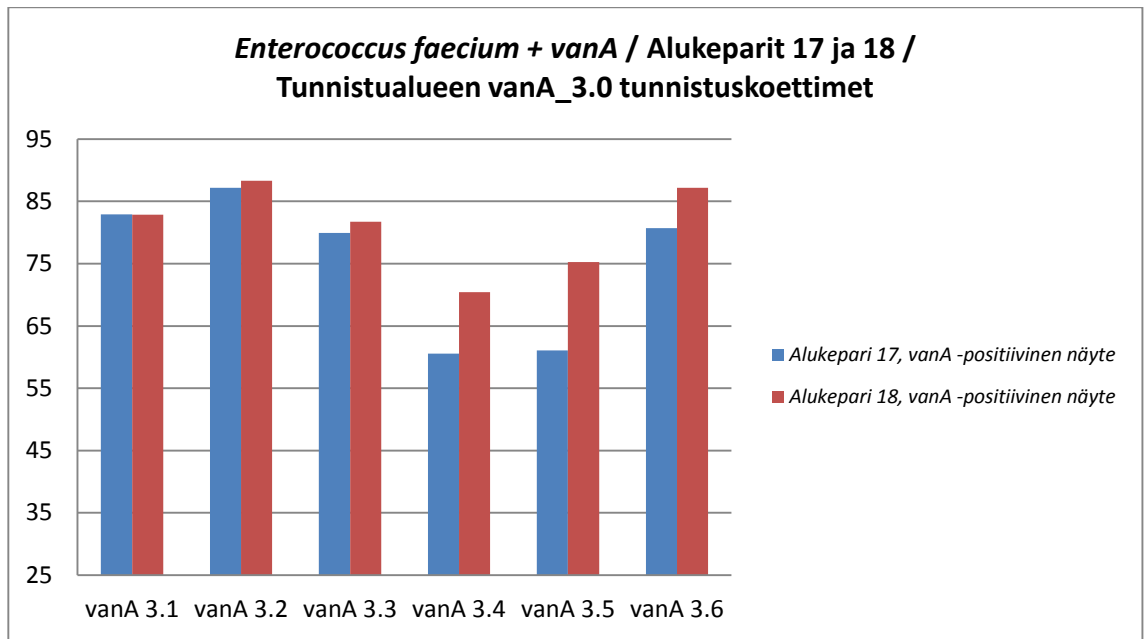
Kuva 5. Taulukossa 11 esiteltyjen alukeparien monistustuotteet AGE:lla tarkasteltuna kun näytteenä on käytetty *vanB2*-tyypin resistenssin omaavaa *E. faecium*-kantaa. Alukeparit 1-12 ovat *vanB*-geenien monistukseen ja alukeparit 13–18 *vanA*-geenin suunniteltuja.



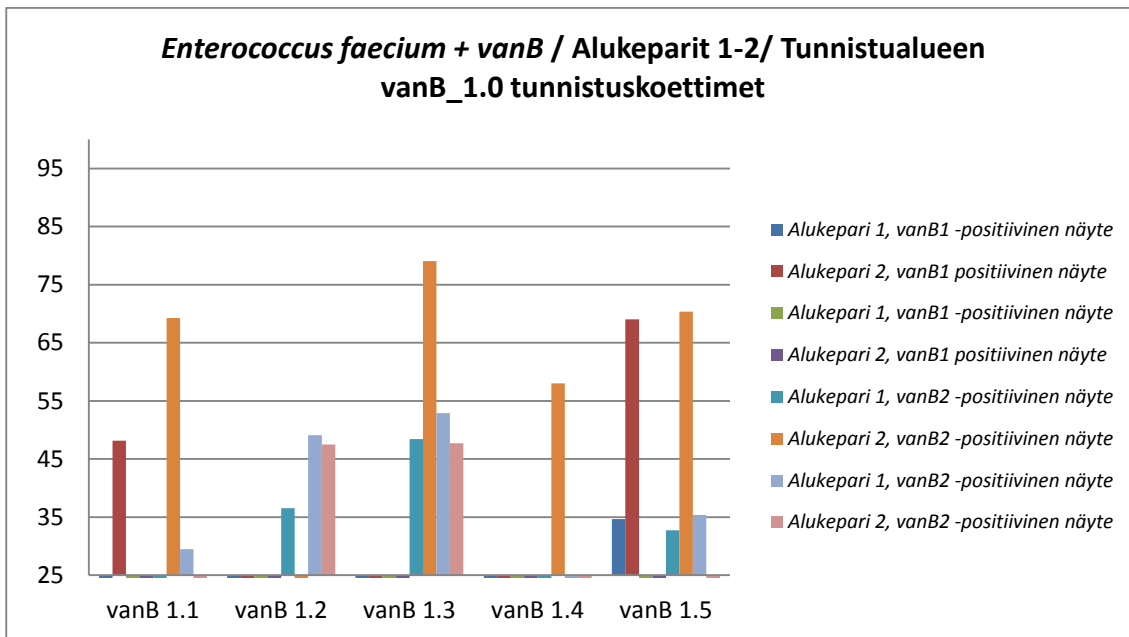
Kuva 6. Taulukossa 11 esiteltujen alukeparien monistustuotteet AGE:lla tarkasteltuna kun näytteenä on käytetty *vanB1*-tyypin resistenssin omaavaa *E. faecium*-kantaa. Alukeparit 1-12 ovat *vanB*-geenien monistukseen ja alukeparit 13–18 *vanA*-geenin suunniteltuja



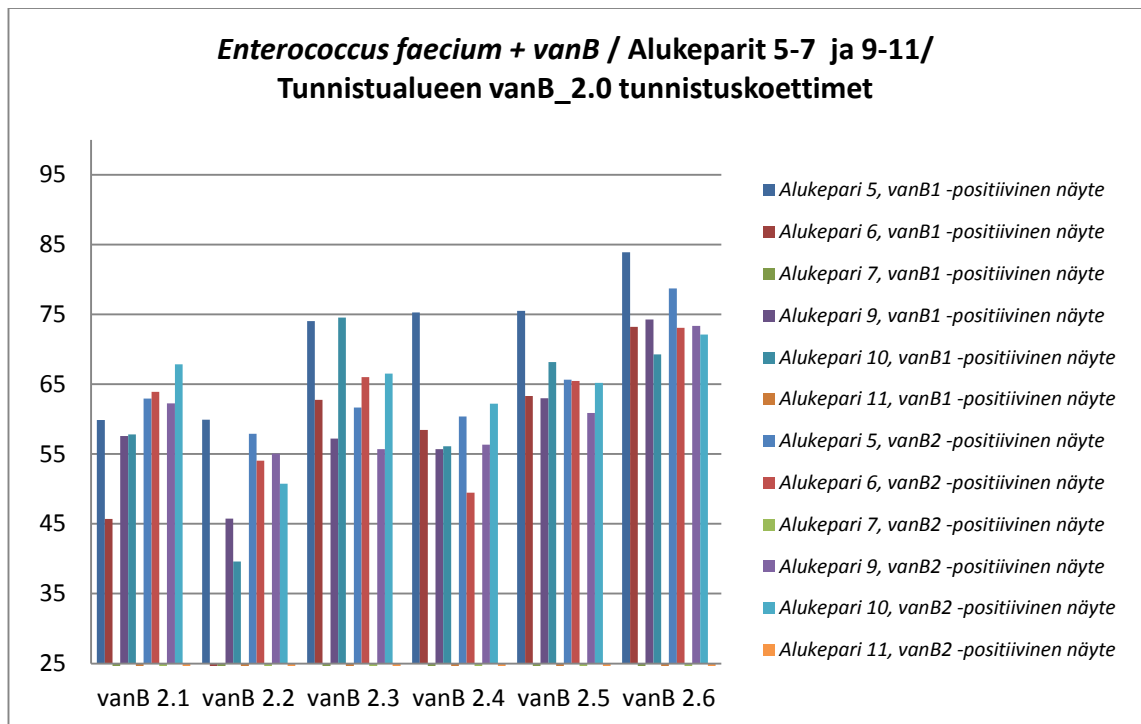
Kuva 7. *vanA*-geenin tunnistusalueelle 1.0 suunniteltujen tunnistuskoettimien *E. faecium* + *vanA* -näytteen kanssa tuottamat suhteelliset signaali-intensiteetit. X-akselilla suunnitellut tunnistuskoettimet ja Y-akselilla niiden suhteelliset signaali-intensiteetit Prove-itTM-mikrosirulta mitattuna. Pylväiden värit edustavat näytteitä, jotka on lueteltu kuvan oikeassa laidassa. Signaali-intensiteetin yksikkönä on %-osuus enimmäisintensiteetistä



Kuva 8. *vanA*-geenin tunnistusalueelle 3.0 suunniteltujen tunnistuskoettimien *E. faecium* + *vanA* -näytteen kanssa tuottamat suhteelliset signaali-intensiteetit. X-akselilla suunnitellut tunnistuskoettimet ja Y-akselilla niiden suhteelliset signaali-intensiteetit Prove-it™-mikrosirulta mitattuna. Pylväiden värit edustavat näytteitä, jotka on lueteltu kuvan oikeassa laidassa. Signaali-intensiteetin yksikkönä on %-osuus enimmäisintensiteetistä



Kuva 9. *vanB1*- ja *vanB2*-geenien tunnistusalueelle 1.0 suunniteltujen tunnistuskoettimien *E. faecium* + *vanB1* ja *E. faecium* + *vanB2* -näytteiden kanssa tuottamat suhteelliset signaali-intensiteetit. X-akselilla suunnitellut tunnistuskoettimet ja Y-akselilla niiden suhteelliset signaali-intensiteetit Prove-it™ -mikrosirulta mitattuna. Pylväiden värit edustavat näytteitä, jotka on lueteltu kuvan oikeassa laidassa. Signaali-intensiteetin yksikkönä on %-osuus enimmäisintensiteetistä



Kuva 10. *vanB1-* ja *vanB2*-geenien tunnistusalueelle 2.0 suunniteltujen tunnistuskoettimien *E. faecium* + *vanB1-* ja *E. faecium* + *vanB2* -näytteiden kanssa tuottamat suhteelliset signaali-intensiteetit Prove-it™-mikrosirulta mitattuna. X-akselilla suunnitellut tunnistuskoettimet kahteen kertaan toistoprinttauksen takia ja Y-akselilla niiden suhteelliset signaali-intensiteetit. Pylväiden värit edustavat näytteitä, jotka on lueteltu kuvan oikeassa laidassa. Signaali-intensiteetin yksikkönä on %-osuus enimmäisintensiteetistä

4.2.2 Herkkyyskokeet valituille aluke-tunnistuskoetin yhdistelmille

Herkkyyskokeita varten valittiin suunnitelluista alukkeista ja tunnistuskoettimista alustavissa kokeissa parhaiten toimineet. *vanA*-geenin herkkyystestaukset tehtiin taulukon 7 alukeparilla 18 ja taulukon 5 tunnistuskoettimilla *vanA* 3.1, *vanA* 3.3, *vanA* 3.5 ja *vanA* 3.6. *vanB*-geenien osalta herkkyystesteihin valikoituivat taulukon 7 alukepari 5 ja taulukon 5 tunnistuskoettimet *vanB* 2.1, *vanB* 2.3, *vanB* 2.5 sekä *vanB* 2.6. Jotta

herkkydet voitiin määrittää samanaikaisesti resistenssigeenin ja sen omaavan bakteerin osalta lisättiin testeissä käytettyyn PCR-reaktioseokseen edellä mainittujen alukkeiden lisäksi myös bakteeritunnistukseen käytettäviä Prove-it™ Sepsis-testin alukeseoksia. PCR-seos muokattiin Prove-it™ Sepsiksen käyttöohjeesta niin, että lisättyjen *vanA*- ja *vanB*-alukkeiden pipetoitu määrä vähennettiin seokseen pipetoitavan veden määrästä. Tällä varmistettiin se, että reaktiossa käytettyjen kaupallisten alukeseosten ja sisäisen monistuskontrollin käyttökonsentraatiot pysyivät samoina kuin tuotteen normaalikäytössä. PCR:ssä käytetyn reaktioseoksen suhteet on esitetty taulukossa 11. *VanA*- ja *vanB*-tyypin glykopeptidiresistenssien osalta positiivisen tunnistuksen katsottiin koostuvan sekä resistenssigeenin että sen omaavan lajin tunnistuksesta. Koska herkkyyttä eniten rajoittavaksi tekijäksi todettiin bakteerin lajitunnistus, herkkyysrajat määriteltiin resistenssigeeniä kantavan bakteerin genomiekvivalenteina. Herkkyystestauksen tulokset on esitelty taulukoissa 12–15. Herkkyyskokeiden yhteydessä hyödynnettiin myös Prove-it™ Advisor -ohjelmiston mahdollistamaa tunnistusalgoritmia, jonka avulla tiettyjen tunnistusääntöjen mukaisesti, testattu näyte voitiin yksiselitteisesti tulkita negatiiviseksi tai positiiviseksi minkä tahansa testin paneeliin sisältyvän patogeenin tai resistenssigeenin suhteen. Tutkittujen näytteiden osalta Prove-it™ Advisor -ohjelmistoon syötetty algoritmi määritteli positiiviseksi kaikki sellaiset *E. faecalis* ja *E. faecium*-näytteet, jotka tuottivat tunnistukseen riittävät suhteelliset intensiteetit vähintään neljällä lajikohtaisella tunnistuskoettimella kuudesta (jokainen kolmesta tunnistuskoettimesta oli kahteen kertaan printattuna mikrosirulle). *vanA*- ja *vanB*-resistenssigeenien tunnistuksessa positiiviseksi tulkittiin näyte, jossa vähintään kuusi kahdeksasta tunnistuskoettimesta tuotti riittävän suhteellisen intensiteettiarvon.

Taulukko 12. *vanA*-positiivisesta *E. faecalis*-näytteestä tehdyn laimennossarjan tuottamat suhteelliset intensiteetit sekä Prove-it™ Sepsis -testin *E. faecalis*-tunnistuskoeittimille että *vanA*-geenin tunnistukseen suunnitelluille kokeellisille tunnistuskoeittimille. Tunnistustulos määräytyy Prove-it™ Advisor -ohjelmiston tunnistusalgoritmin perusteella. Signaali-intensiteetin yksikkönä on %-osuus enimmäisintensiteetistä

Bakteerilaji ja resistenssityyppi	DNA:n määrä PCR -reaktiossa	Tunnistustulos	Genomiekvivalentteja	<i>E.faecalis</i> _1	<i>E.faecalis</i> _2	<i>E.faecalis</i> _3	<i>vanA</i> _3.1	<i>vanA</i> _3.3	<i>vanA</i> _3.5	<i>vanA</i> _3.6
<i>Enterococcus faecalis</i> + <i>vanA</i>	500 pg	<i>E. faecalis</i> , <i>vanA</i>	136910,0364	90,585	74,51	89,605	89,805	86,47	87,06	88,63
<i>Enterococcus faecalis</i> + <i>vanA</i>	50 pg	<i>E. faecalis</i> , <i>vanA</i>	13691,00364	90,2		70,395	90,785	87,65	86,275	88,63
<i>Enterococcus faecalis</i> + <i>vanA</i>	5 pg	<i>vanA</i>	1369,100364	79,015			88,24	85,685	79,61	82,94
<i>Enterococcus faecalis</i> + <i>vanA</i>	500 fg	<i>vanA</i>	136,9100364				88,435	82,745	65,295	63,725

Taulukko 13. *vanB1*- ja *vanB2*-positiivisista *E. faecalis*-näytteistä tehtyjen laimennossarjojen tuottamat suhteelliset intensiteetit sekä Prove-it™ Sepsis -testin *E. faecalis*-tunnistuskoeittimille että *vanB1* ja *vanB2*-geenien tunnistukseen suunnitelluille kokeellisille tunnistuskoeittimille. Tunnistustulos määräytyy Prove-it™ Advisor -ohjelmiston tunnistusalgoritmin perusteella. Signaali-intensiteetin yksikkönä on %-osuus enimmäisintensiteetistä

Bakteerilaji ja resistenssityyppi	DNA:n määrä PCR -reaktiossa	Tunnistustulos	Genomiekvivalentteja	<i>E.faecalis</i> _1	<i>E.faecalis</i> _2	<i>E.faecalis</i> _3	<i>vanB</i> _2.1	<i>vanB</i> _2.3	<i>vanB</i> _2.5	<i>vanB</i> _2.6
<i>Enterococcus faecalis</i> + <i>vanB1</i>	500 pg	<i>E. faecalis</i> , <i>vanB</i>	136910,0364	89,61	87,45	88,43	86,665	91,37	90,195	91,37
<i>Enterococcus faecalis</i> + <i>vanB1</i>	50 pg	<i>E. faecalis</i> , <i>vanB</i>	13691,00364	90,785	55,685	84,315	89,605	90	90,195	86,865
<i>Enterococcus faecalis</i> + <i>vanB1</i>	5 pg	<i>E. faecalis</i> , <i>vanB</i>	1369,100364	90,39		67,845	89,215	88,235	86,075	87,055
<i>Enterococcus faecalis</i> + <i>vanB1</i>	500 fg	<i>vanB</i>	136,9100364				24,12	64,9	61,96	66,275
<i>Enterococcus faecalis</i> + <i>vanB2</i>	500 pg	<i>E. faecalis</i> , <i>vanB</i>	136910,0364	90,98	88,04	90,2	89,41	88,63	87,255	88,235
<i>Enterococcus faecalis</i> + <i>vanB2</i>	50 pg	<i>E. faecalis</i> , <i>vanB</i>	13691,00364	91,37	73,135	89,02	89,8	89,805	86,08	87,645
<i>Enterococcus faecalis</i> + <i>vanB2</i>	5 pg	<i>E. faecalis</i> , <i>vanB</i>	1369,100364	89,41	46,08	71,96	90,195	87,45	86,475	87,255
<i>Enterococcus faecalis</i> + <i>vanB2</i>	500 fg	<i>E. faecalis</i> , <i>vanB</i>	136,9100364	87,255		45,685	90,195	90,59	87,06	88,825

Taulukko 14. *vanA*-positiivisesta *E. faecium*-näytteestä tehdyn laimennossarjan tuottamat suhteelliset intensiteetit sekä Prove-it™ Sepsis -testin *E. faecalis*-tunnistuskoeittimille että *vanA*-geenin tunnistukseen suunnitelluille kokeellisille tunnistuskoeittimille. Tunnistustulos määräytyy Prove-it™ Advisor -ohjelmiston tunnistusalgorithmilla perusteella. Signaali-intensiteetin yksikkönä on %-osuus enimmäisintensiteetistä

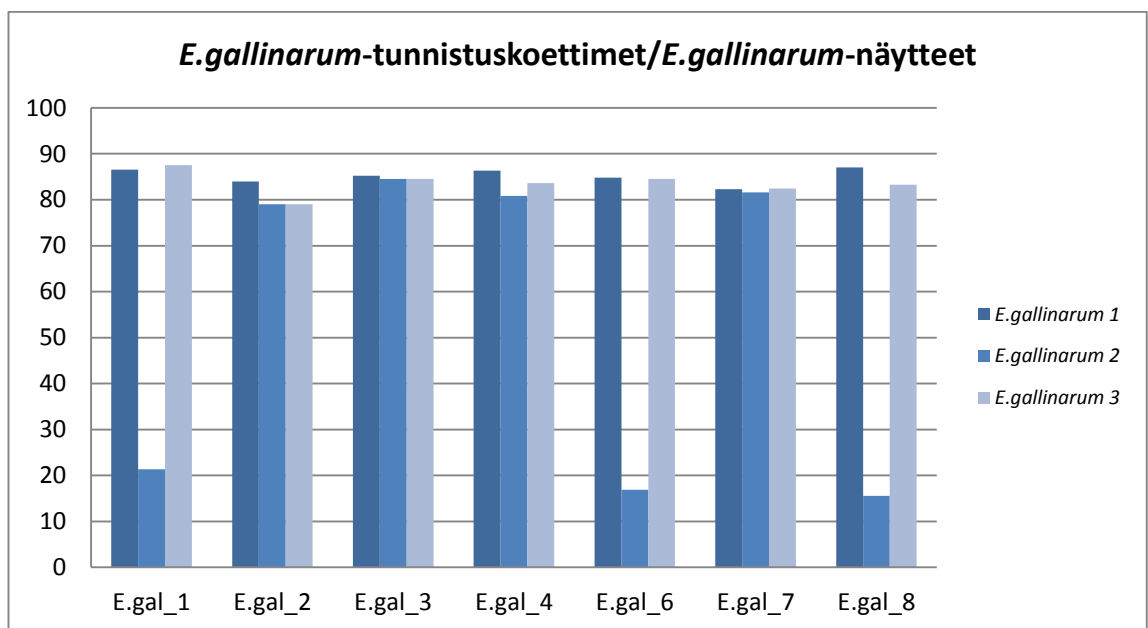
Bakteerilaji ja resistenssityyppi	DNA:n määrä PCR -reaktiossa	Tunnistustulos	Genomiekvivalentteja	<i>E.faecium_1</i>	<i>E.faecium_2</i>	<i>E.faecium_3</i>	<i>vanA_3.1</i>	<i>vanA_3.3</i>	<i>vanA_3.5</i>	<i>vanA_3.6</i>
<i>Enterococcus faecium</i> + <i>vanA</i>	500 pg	<i>E.faecium, vanA</i>	149842,9063	85,095	84,51	83,53	80,195	86,865	86,67	90
<i>Enterococcus faecium</i> + <i>vanA</i>	50 pg	<i>E.faecium, vanA</i>	14984,29063	47,455	47,45	64,115	90,78	88,825	86,08	88,435
<i>Enterococcus faecium</i> + <i>vanA</i>	5 pg	<i>vanA</i>	1498,429063				87,645	87,255	84,705	87,84
<i>Enterococcus faecium</i> + <i>vanA</i>	500 fg	<i>vanA</i>	149,8429063				90,59	85,885	83,53	84,51

Taulukko 15. *vanB-1* ja *vanB2*-positiivisista *E. faecium*-näytteistä tehtyjen laimennossarjojen tuottamat suhteelliset intensiteetit sekä Prove-it™ Sepsis testin *E. faecalis*-tunnistuskoeittimille että *vanB1* ja *vanB2*-geenien tunnistukseen suunnitelluille kokeellisille tunnistuskoeittimille. Tunnistustulos määräytyy Prove-it™ Advisor -ohjelmiston tunnistusalgorithmilla perusteella. Signaali-intensiteetin yksikkönä on %-osuus enimmäisintensiteetistä

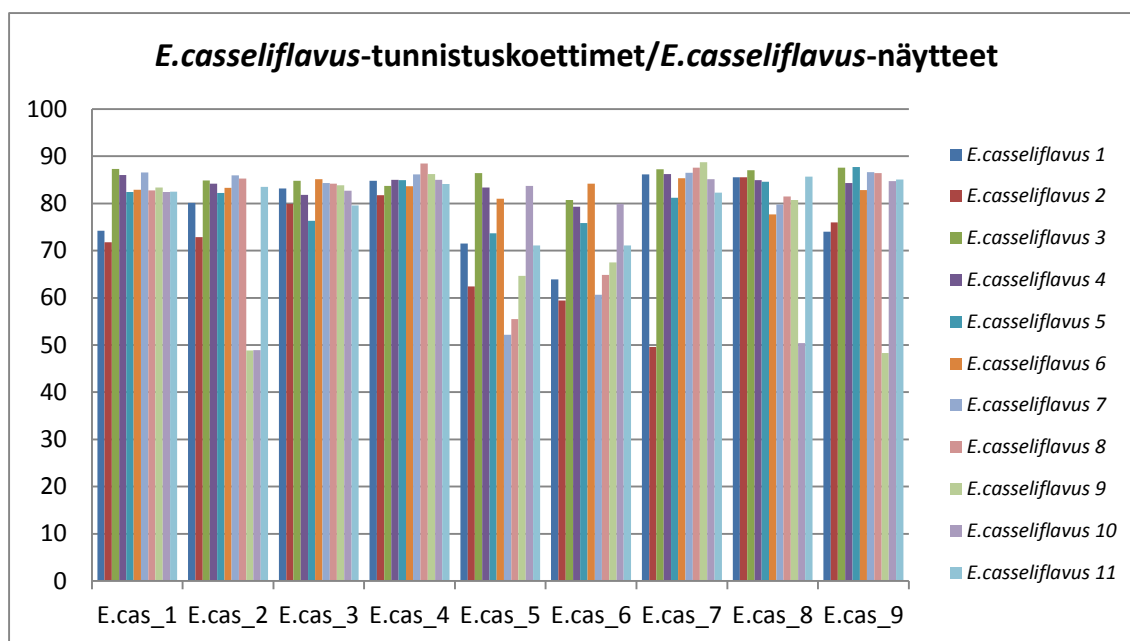
Bakteerilaji ja resistenssityyppi	DNA:n määrä PCR -reaktiossa	Tunnistustulos	Genomiekvivalentteja	<i>E.faecium_1</i>	<i>E.faecium_2</i>	<i>E.faecium_3</i>	<i>vanB_2.1</i>	<i>vanB2.3</i>	<i>vanB_2.5</i>	<i>vanB_2.6</i>
<i>Enterococcus faecium</i> + <i>vanB1</i>	500 pg	<i>E.faecium, vanB</i>	149842,9063	85,49	85,885	88,825	81,57	88,825	86,475	87,255
<i>Enterococcus faecium</i> + <i>vanB1</i>	50 pg	<i>E.faecium, vanB</i>	14984,29063	56,47	58,235	68,625	63,53	89,41	86,275	86,67
<i>Enterococcus faecium</i> + <i>vanB1</i>	5 pg	<i>E.faecium, vanB</i>	1498,429063	39,02	40,195	51,175	30,78	85,49	83,925	85,295
<i>Enterococcus faecium</i> + <i>vanB1</i>	500 fg	<i>vanB</i>	149,8429063					67,84	68,04	70
<i>Enterococcus faecium</i> + <i>vanB2</i>	500 pg	<i>E.faecium, vanB</i>	149842,9063	88,04	88,435	90,395	86,08	90,195	85,69	85,095
<i>Enterococcus faecium</i> + <i>vanB2</i>	50 pg	<i>E.faecium, vanB</i>	14984,29063	51,57	46,665	63,33	90,395	90,59	86,08	87,84
<i>Enterococcus faecium</i> + <i>vanB2</i>	5 pg	<i>E.faecium, vanB</i>	1498,429063	50,395	47,845	60,785	62,155	84,315	81,37	85,49
<i>Enterococcus faecium</i> + <i>vanB2</i>	500 fg	<i>vanB</i>	149,8429063				58,235	80,785	77,84	84,315

4.3 *E. casseliflavus*lle ja *E. gallinarum*ille suunniteltujen tunnistuskoettimien signaali-intensiteettikokeet kohdelajista eristettyjen DNA-näytteiden kanssa

Suunniteltujen tunnistuskoettimien kohdenäytteiden kanssa tuottamat suhteelliset signaali-intensiteetit on esitelty *E. gallinarum*ille kuvassa 11 ja *E. casseliflavus*ille kuvassa 12. Diagrammien X-akselilla ovat kaikki suunnitellut koettimet kahtena toistona, kuten ne printattiin mikrosiruille, ja Y-akselilla on Prove-it™ Advisorin ilmoittama signaali-intensiteetti suhteessa taustaan asteikolla 1-100 % esimmäisintensiteetistä (100 % = täysin musta, 0 % = täysin valkoinen). Pylväiden värit edustavat näytteitä, jotka on lueteltu kuvien oikeassa reunassa.



Kuva 11. *E. gallinarum*ille suunniteltujen tunnistuskoettimien *E. gallinarum*-näytteiden kanssa tuottamat suhteelliset signaali-intensiteetit. X-akselilla suunnitellut tunnistuskoettimet niiden suhteelliset signaali-intensiteetit Prove-it™-mikrosirulta mitattuna. Pylväiden värejä vastaavat näytteet on lueteltu kuvan oikeassa laidassa. Signaali-intensiteetin yksikkönä on %-osuus ensimmäisintensiteetistä

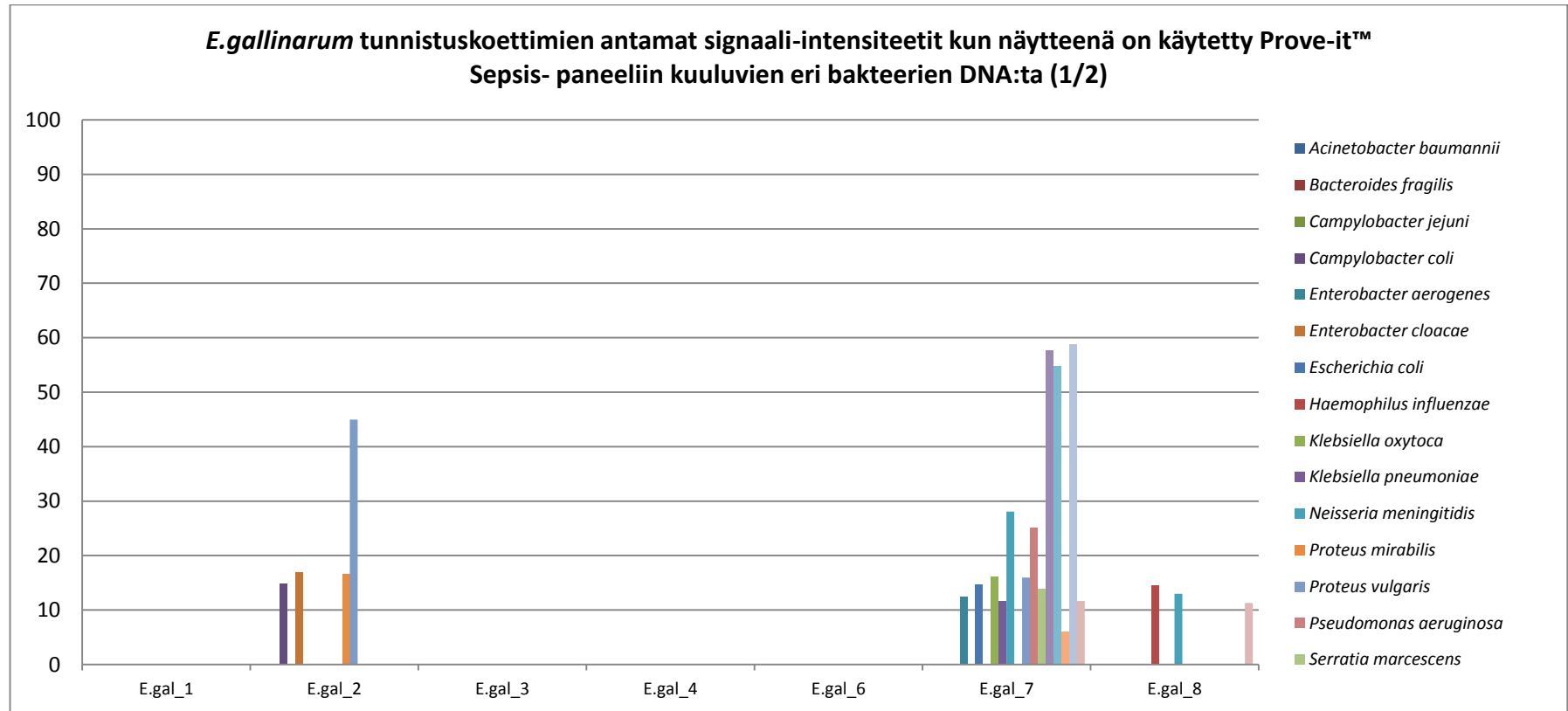


Kuva 12. *E.casseliflavus*ille suunniteltujen tunnistuskoettimien *E.casseliflavus*-näytteiden kanssa tuottamat suhteelliset signaali-intensiteetit Prove-it™-mikrosirulta mitattuna. X-akselilla suunnitellut tunnistuskoettimet kahteen kertaan toistoprinttauksen takia ja Y-akselilla niiden suhteelliset signaali-intensiteetit. Pylväiden värejä vastaavat näytteet on lueteltu kuvan oikeassa laidassa. Signaali-intensiteetin yksikkönä on %-osuus enimmäisintensiteetistä

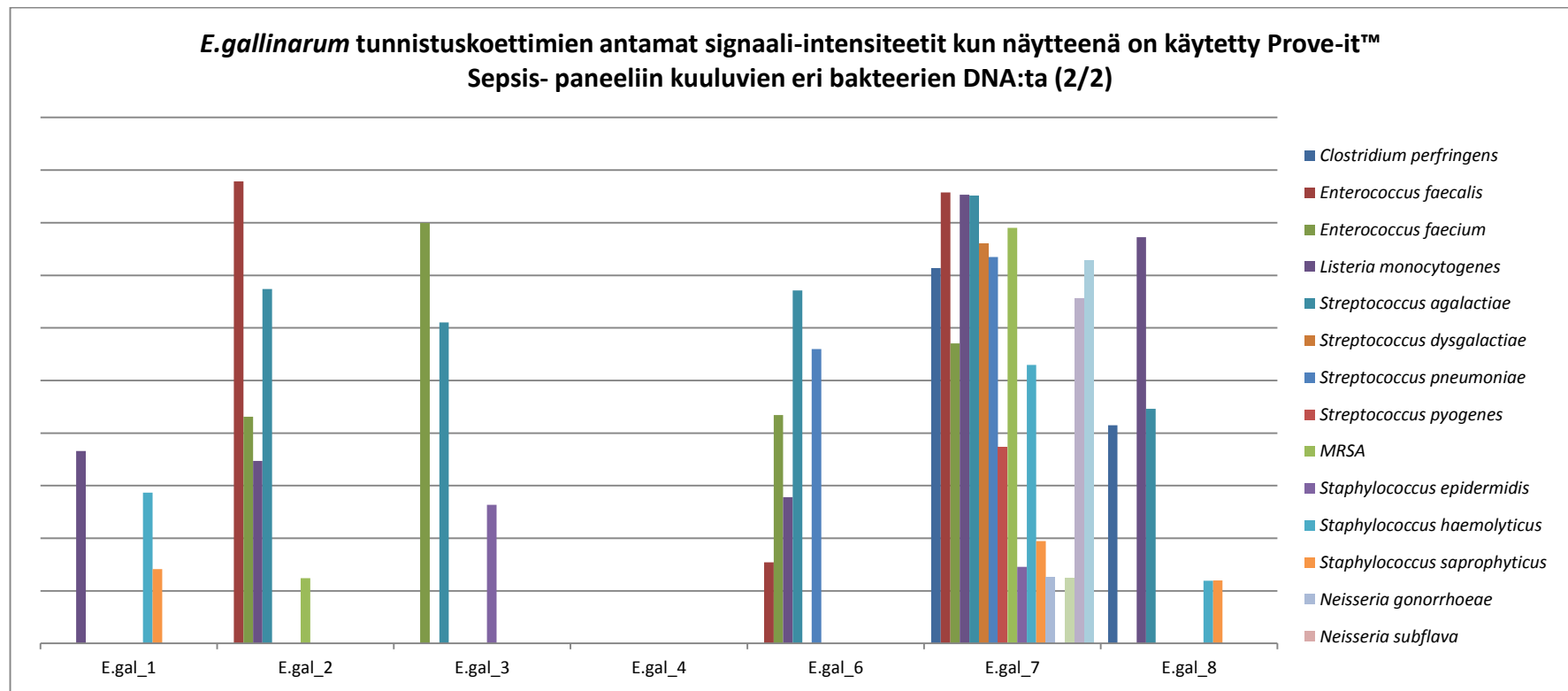
4.4 *E. casseliflavus*ille ja *E. gallinarum*ille suunniteltujen tunnistuskoettimien signaali-intensiteettikokeet muiden kuin kohdelajista eristettyjen DNA-näytteiden kanssa

*E.casseliflavus*ille ja *E.gallinarum*ille suunniteltujen tunnistuskoettimien muiden kuin kohdelajien kanssa tuottamat suhteelliset signaali-intensiteetit on esitelty kuvissa 13, 14, 15 ja 16. Tunnistuskoettimia testattiin suurimman osan Prove-it™ Sepsis-paneelin lajien kanssa kuitenkin niin, että esimerkiksi Prove-it™ Sepsis paneeliin kuuluvia *Salmonella*-suvun lajeja ei testattu kaikkia erikseen vaan testaamisen käytettiin kliinisesti merkityksellistä *Salmonella enterica* sp. *enterica*-lajin yhtä serotyyppiä eli

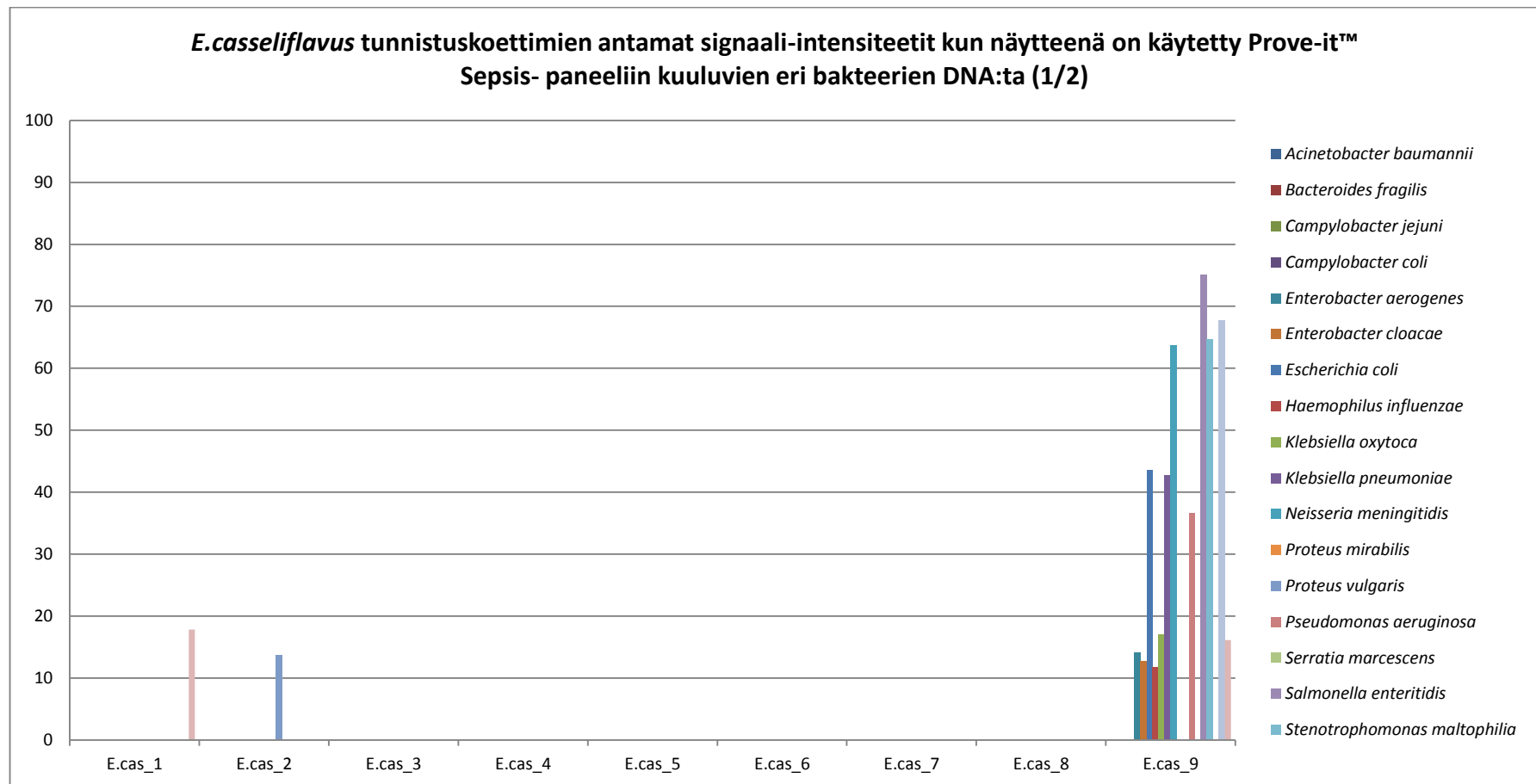
Salmonella enteritidis -näytettä. Sen katsottiin antavan riittävän indikaation siitä, onko testatut koettimet taipuvaisia ristireaktioihin *Salmonella enterica* sp. *enterican* -lajin eri serotyyppeiden kanssa.



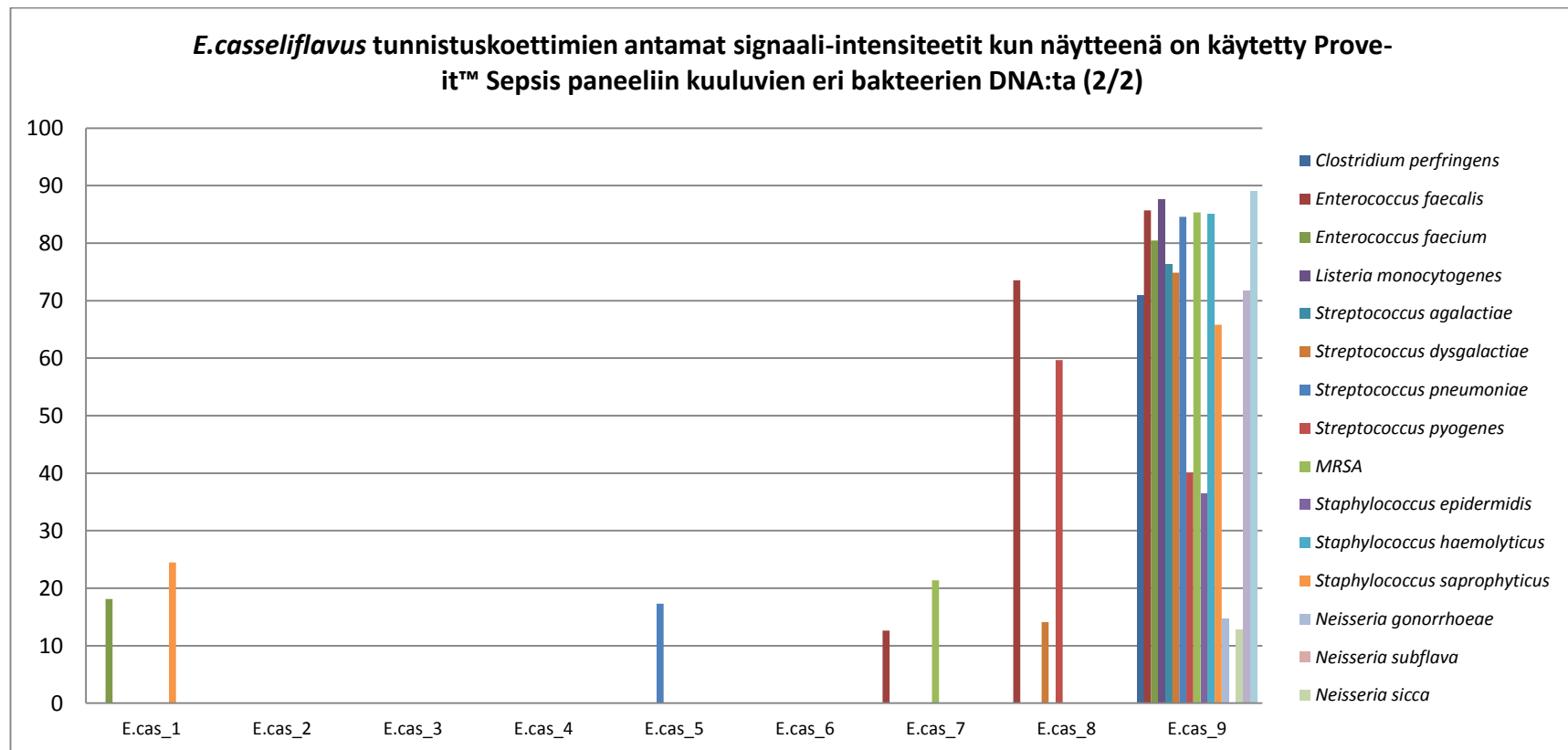
Kuva 13. *E.gallinarumille* -suunniteltujen tunnistuskoettimien eri Prove-it™ Sepsis –paneeliin kuuluvista bakteerilajeista eristettyjen DNA – näytteiden kanssa tuottamat suhteelliset signaali-intensiteetit Prove-it™ -mikrosirulta mitattuna. X-akselilla on suunnitellut tunnistuskoettimet ja Y-akselilla niiden suhteelliset signaali-intensiteetit. Pylväiden värejä vastaavat näytteet on lueteltu kuvan oikeassa laidassa. Signaali-intensiteetin yksikkönä on %-osuus enimmäisintensiteetistä



Kuva 14. *E. gallinarum* suunniteltujen tunnistuskoettimien eri Prove-it™ Sepsis -paneeliin kuuluvista bakteerilajeista eristettyjen DNA-näytteiden kanssa tuottamat suhteelliset signaali-intensiteetit Prove-it™-mikrosirulta mitattuna. X-akselilla on suunnitellut tunnistuskoettimet ja Y-akselilla niiden suhteelliset signaali-intensiteetit. Pylväiden värejä vastaavat näytteet on lueteltu kuvan oikeassa laidassa. Signaali-intensiteetin yksikkönä on %-osuus enimmäisintensiteetistä



Kuva 15. *E.casseliflavusille* suunniteltujen tunnistuskoettimien eri Prove-it™ Sepsis -paneeliin kuuluvista bakteerilajeista eristettyjen DNA-näytteiden kanssa tuottamat suhteelliset signaali-intensiteetit Prove-it™-mikrosirulta mitattuna. X-akselilla on suunnitellut tunnistuskoettimet ja Y-akselilla niiden suhteelliset signaali-intensiteetit Pylväiden värejä vastaavat näytteet on lueteltu kuvan oikeassa laidassa. Signaali-intensiteetin yksikkönä on %-osuus enimmäisintensiteetistä



Kuva 16. *E.casseliflavusille* suunniteltujen tunnistuskoettimien eri Prove-it™ Sepsis -paneeliin kuuluvista bakteerilajeista eristettyjen DNA-näytteiden kanssa tuottamat suhteelliset signaali-intensiteetit Prove-it™-mikrosirulta mitattuna. X-akselilla on suunnitellut tunnistuskoettimet ja Y-akselilla niiden suhteelliset signaali-intensiteetit. Pylväiden värejä vastaavat näytteet on lueteltu kuvan oikeassa laidassa. Signaali-intensiteetin yksikkönä on %-osuus enimmäisintensiteetistä

4.5 Herkkyyskokeet *E. casseliflavus*- ja *E. gallinarum*-tunnistuskoettimille

*E. casseliflavus*in ja *E. gallinarum*in tunnistukseen suunniteltujen tunnistuskoettimien herkkyystestauksiin valittiin intensiteetti- ja ristireaktiokokeiden perusteella neljä parhaiten toiminutta tunnistuskoetinta kummallekin lajille. Testit tehtiin Prove-it™ Sepsis -testin työohjeen mukaan ilman protokollan muokkausta, sillä kohde-DNA:n monistus tapahtui Prove-it™ yleisbakteeri-PCR:llä. Näytteinä käytettiin taulukossa 4 esiteltyjä *E. casseliflavus*- ja *E. gallinarum*- laimennossarjoja. Herkkyystestien tulokset on esitelty taulukoissa 16 ja 17.

Taulukko 16. *E.casseliflavusista* eristetyistä DNA-näytteistä tehdyn laimennossarjan tuottamat suhteelliset intensiteetit *E.casseliflavus*-tunnistuskoeittimille. Signaali-intensiteetin yksikkönä on %-osuus enimmäisintensiteetistä

Bakteerilaji ja resistenssityyppi	DNA:n määrä PCR -reaktiossa	Tunnistustulos	Genomiekvivalentteja	E.cas_1	E.cas_2	E.cas_3	E.cas_4
<i>Enterococcus casseliflavus</i>	500 pg	<i>E.casseliflavus</i>	133531,9949	83,725	73,335	72,355	78,435
<i>Enterococcus casseliflavus</i>	50 pg	negatiivinen	13353,19949	25,295			21,765
<i>Enterococcus casseliflavus</i>	5 pg	negatiivinen	1335,319949				
<i>Enterococcus casseliflavus</i>	500 fg	negatiivinen	133,5319949				

Taulukko 17. *E. gallinarumista* eristetyistä DNA-näytteistä tehdyn laimennossarjan tuottamat suhteelliset intensiteetit *E.gallinarum*-tunnistuskoeittimille. Signaali-intensiteetin yksikkönä on %-osuus enimmäisintensiteetistä

Bakteerilaji ja resistenssityyppi	DNA:n määrä PCR -reaktiossa	Tunnistustulos	Genomiekvivalentteja	E.gal_1	E.gal_3	E.gal_4	E.gal_6
<i>Enterococcus gallinarum</i>	500 pg	<i>E.gallinarum</i>	146970,5183	88,63	92,16	90	88,235
<i>Enterococcus gallinarum</i>	50 pg	negatiivinen	14697,05183		88,43	78,825	
<i>Enterococcus gallinarum</i>	5 pg	negatiivinen	1469,705183				
<i>Enterococcus gallinarum</i>	500 fg	negatiivinen	146,9705183				

4.6 Testaus *Hôpital de bicêtre*'stä saaduilla puhdasviljelmäkannoilla

Herkkyytestuksen jälkeen oligoiden toimivuutta tarkasteltiin *Hôpital de bicêtre*'stä saaduilla kliinistä alkuperää olevilla puhdasviljelmäkannoilla. Testauksen tarkoituksena oli varmistaa, että suunnitellut alukkeiden avulla voidaan tunnistaa myös muita kuin suunnitteluun käytettyjä enterokokkikantoja. Taulukossa 18 on esitetty käytettyjen näytteiden osalta *Hôpital de bicêtre*'stä ilmoitettu lajin tunnistamiseksi tehdyn viljelyn tulos sekä antibioottiresistenssin tunnistamiseksi tehdyn PCR:n tulos. Taulukossa on myös ilmoitettu edellä mainittujen oligoiden avulla saatu PCR-mikrosiruhybridisaatiotulos

Taulukko 18. Hospital de bicetre'n toimittamista näytteistä viljelytekniikoiden avulla saadut tulokset verrattuna tutkimuksessa kehitetyn DNA-pohjaisen tunnistuksen avulla saatuihin tuloksiin.

Näytteen juokseva nro.	Näytekoodi	Viljelytulos	Resistenssityyppi	Mikrosirutestin tuottama tunnistustulos
1	Dn4709	<i>E.faecium</i>	vanA	<i>Enterococcus faecium</i> , vanA
2	Dn4710	<i>E.faecium</i>	vanA	<i>Enterococcus faecium</i> , vanA
3	Dn4711	<i>E.casseliflavus</i>	vanC2	<i>Enterococcus casseliflavus</i>
4	Dn4712	<i>E.gallinarum</i>	vanC1	<i>Enterococcus gallinarum</i>
5	Dn4713	<i>E.faecium</i>	vanA	<i>Enterococcus faecium</i> , vanA
6	Dn4714	<i>E.faecalis</i>	vanB	<i>Enterococcus faecalis</i> , vanB
7	Dn4715	<i>E.faecium</i>	vanA	<i>Enterococcus faecium</i> , vanA
8	Dn4716	<i>E.faecium</i>	vanA	<i>Enterococcus faecium</i> , vanA
9	Dn4717	<i>E.faecium</i>	vanA	<i>Enterococcus faecium</i> , vanA
10	Dn4718	<i>E.faecium</i>	vanA	<i>Enterococcus faecium</i> , vanA
11	Dn4719	<i>E.faecium</i>	vanB	<i>Enterococcus faecium</i>
12	Dn4720	<i>E.faecium</i>	–	<i>Enterococcus faecium</i>
13	Dn4721	<i>L. gergoviae</i>	–	<i>Enterococcus gallinarum</i>

5. Tulosten tarkastelu

5.1 Tunnistuskoettimien ja alukkeiden suunnittelu

Resistenssigeenien *vanA*, *vanB1* ja *vanB2* monistamiseen tarkoitettuja alukkeita suunniteltiin vähintään kaksi jokaiselle paikannetulle tunnistusalueelle, mutta erityisesti *reverse*-alukkeita pyrittiin suunnittelemaan useampia, sillä niiden yksijuosteisen DNA:n tuottokykyä oli vaikea arvioida pelkän bioinformaattisen tarkastelun pohjalta, minkä vuoksi empiirisen testauksen tiedettiin olevan merkityksellisessä roolissa alukepareja valittaessa. Potentiaalisia tunnistusalueita paikannettiin kummallekin geenille kaksi niin, että *vanB*-geenien osalta tunnistusalueet sisälsivät mahdollisimman paljon yhteneviä DNA-jaksoja, sillä tavoitteena oli tunnistaa *vanB*-genotyyppi ilman alatyypin erottelua. Alukkeiden toimivuuden maksimoimiseksi, niiden T_m -arvot pyrittiin asettamaan välille 58–60°C, jotta niiden toimintakyky olisi optimaalista PCR-ohjelmassa käytetyssä sitoutumislämpötilassa (52°C). Alukkeen sitoutumislämpötilaan voidaan vaikuttaa sekvenssin pituudella. *Reverse*-alukkeiden T_m -arvojen tuli sen sijaan olla lähellä 70°C, sillä niiden tarkoituksena oli toimia myös käytetyn PCR-ohjelman kaksiportaisten, yksijuosteisen DNA:n tuottoon tähtäävien, monistusvaiheiden aikana, jolloin sitoutumislämpötiloina käytetään 65°C ja 68°C. Alukkeiden pituuksien tuli olla n. 20–30 emästä ja niiden 3'-päästä luettuna viiden ensimmäisen emäksen joukossa tuli olla vähintään yksi ja korkeintaan kolme guaniinia tai sytosiinia. Lisäksi sekvenssien tuli tuottaa NCBI:n BLAST-haussa 100 % yhdenmukaisuus ainoastaan kohdegeeninsä kanssa. 100 % yhdenmukaisuuden tuottavat sekvenssit ovat emäsjärjestykseltään identtisiä. Lisäksi suunniteltujen alukkeiden guaniini-sytosiini-emäspitoisuuden tuli ylittää 40 %, jota yleisesti pidetään edellytyksenä alukkeen toimivuudelle.

Tunnistuskoettimia kullekin kohdegeenille suunniteltiin niin monta kuin oli käytettyjen linjausten ja geenialueiden kokojen mukaan mahdollista ja järkevää. Suunnittelussa käytetty *gyrB*-geenialue oli pituudeltaan n. 300 emäsparia ja resistenssigeenien *vanA*, *vanB1* ja *vanB2* tunnistamiseen valitut tunnistusalueet

pituuksiltaan n. 200 emäsparia. Erityisesti *E. gallinarumin* kohdalla sopivien tunnistuskoettimien suunnittelu oli paikoin hankalaa, sillä kyseinen geenialue sisälsi huomattavasti enemmän adeniini- ja tymiinirikkaita jaksoja kuin *E. casseliflavus* kohdalla. Runsaasti adeniinia ja tymiiniä sisältävät DNA-jaksot ovat sitoutumisominaisuuksiltaan usein taipuvaisia epäspesifisyyteen ja lisäksi tällaisten jaksojen sulamislämmöt jäävät alhaisiksi, jos halutaan pitää tunnistuskoettimen koko 20—30 emäsparin välillä. Myös sekä *vanB1* että *vanB2* geeneille identtisten geenialueiden paikantaminen oli haastavaa ja osaan testatuista tunnistuskoettimista saattoikin jäädä yhden emäksen poikkeavuuksia toisen geenivariantin suhteen. Tunnistuskoettimille ennakoon asetetut vaatimukset olivat pitkälti samat kuin alukkeidenkin kohdalla, T_m -arvoa lukuunottamatta, jonka tuli tunnistuskoettimien kohdalla olla korkeampi kuin käytetty hybridisaatiolämpö (55°C). Kaikki tässä työssä suunnitellut alukkeet ja tunnistuskoettimet täyttivät edellä mainitut vaatimukset, mainittuja poikkeuksia lukuunottamatta.

5.2 Resistenssigeenien tunnistukseen suunniteltujen alukkeiden ja tunnistuskoettimien testaus

Suurin osa alukepareista tuotti selkeää kohdegeeninsä monistumista AGE:lla tarkasteltaessa, mutta osan pareista kohdalla havaittiin toiminnallisia puutteita jo alustavissa kokeissa. Alukeparit 8, 12, 14 ja 16 eivät tuottaneet silmin havaittavaa PCR-tuotetta kohdegeeninsä sisältävistä DNA-näytteistä. Näistä parit 8 ja 12 olivat suunniteltu *vanB*-geenien monistukseen ja parit 14 ja 16 puolestaan *vanA*-geenin monistamiseen. Lisäksi *vanB*-geenien monistamiseen suunnitellut alukeparit 1 ja 2 monistivat *vanB*-geenien lisäksi *vanA*-geeniä. Edellä mainittuja alukepareja ei otettu mukaan seuraaviin testivaiheisiin, joissa mikrosiruhybridisaation avulla tarkasteltiin alukeparien yksijuosteisen DNA:n tuottokykyä.

Myös mikrosiruhybridisaatiokokeissa havaittiin vaihtelevaa toimivuutta eri alukeparien välillä. Tunnistusalueelle *vanA* 1.0 suunnitelluista kahdesta alukeparista

ainoastaan pari 15 monisti sellaista PCR-tuotetta, joka tuotti merkittävää signaali-intensiteettiä kyseiselle tunnistusalueelle suunniteltujen tunnistuskoettimien kanssa. Sen sijaan alukeparin 13 monistama PCR-tuote ei tuottanut voimakkaita positiivisia hybridisaatioreaktioita, vaikka AGE:lla tarkasteltaessa spesifistä monistusta oli selvästi tapahtunut. Myös kokonaisuutena tunnistusalue vanA 1.0 näytti toimivan heikosti verrattaessa tunnistusalueeseen vanA 3.0, sillä viimeeksi mainitulle suunnitelluista alukepareista molempien monistamat PCR-tuotteet tuottivat voimakkaita signaali-intensiteettejä kaikkien kyseiselle tunnistusalueelle suunniteltujen tunnistuskoettimien kanssa. Alukepari 18 näytti kuitenkin tuottavan kaikista alukepareista parhaiten yksijuosteista DNA:ta. VanB 1.0 tunnistusalueelle suunnitelluista alukepareista ainoastaan pari numero 2 näytti monistavan yksijuosteista DNA:ta edes kohtuullisesti, mutta senkin kohdalla tuloserot *vanB1*- ja *vanB2*-geenien välillä olivat merkittävät. Koska kyseiselle tunnistusalueelle suunnitelluista alukepareista kaikki toimivat heikosti oli syytä epäillä myös alueelle suunniteltujen tunnistuskoettimien toimivuutta. Tunnistusalue VanB 2.0 suunnitelluista alukepareista parin 5 monistama tuote tuotti keskimääräisesti voimakkaimmat signaali-intensiteetit alueelle suunniteltujen tunnistuskoettimien kanssa niin *vanB1*- kuin *vanB2*-näytteiden suhteen. Myös parit 6, 9 ja 10 monistivat yksijuosteista DNA:ta. Sen sijaan alukeparien 7 ja 11 monistamat tuotteet eivät tuottaneet voimakkaita positiivisia hybridisaatioreaktioita alueelle suunniteltujen tunnistuskoettimien kanssa. Mikrosiruhybridisaatiokokeiden perusteella jatkotestaukseen valittiin tunnistusalue vanA 3.0 monistava alukepari 18 ja tunnistusalue vanB 2.0 monistava alukepari 5.

5.3 E. casseliflavusille ja E. gallinarumille suunniteltujen tunnistuskoettimien testaus

E. casseliflavusille ja *E. gallinarumille* suunniteltujen tunnistuskoettimien signaali-intensiteetti-kokeissa havaittiin vaihtelua tunnistuskoettimien toimivuuden välillä. E.

gallinarumille suunnitelluista tunnistuskoettimista E.gal_2, E.gal_3, E.gal_4 ja E.gal_7 tuottivat voimakkaat signaali-intensiteetit kohdelajistaan monistetun PCR-tuotteen kanssa kaikkien testattujen näytteiden osalta. Sen sijaan tunnistuskoettimet E.gal_1, E.gal_6 ja E.gal_8 toimivat hyvin ainoastaan kahden testatun *E. gallinarum*-kannan kanssa kolmesta. *E. casseliflavus*in tapauksessa kaikki suunnitellut tunnistuskoettimet tuottivat voimakkaan signaali-intensiteetin jokaisesta testatusta kannasta monistetun PCR-tuotteen kanssa. Keskimäärin heikoiten toimivat tunnistuskoettimet E.cas_5 ja E.cas_6.

Ristireaktiokokeissa tarkasteltiin *E. casseliflavus*ille ja *E. gallinarum*ille suunniteltujen tunnistuskoettimien taipumusta muodostaa positiivisiin hybridisaatioreaktioihin johtavia kaksijuosteisia rakenteita Prove-it™ Sepsis -testin monikohde-PCR:llä monistettujen tuotteiden kanssa, kun näytteinä käytettiin muita patogeeneja kuin suunniteltujen koettimien kohdelajit. Kokeissa testattiin lähes kaikki Prove-it™ Sepsis -paneelin lajit. Tuloksista nähdään, että *E. gallinarum*ille suunnitelluista koettimista kaikki, E.gal_4 koetinta lukuunottamatta, tunnistivat myös jotain muuta testatun paneelin bakteeria. Koetin E.gal_1 toimi melko spesifisesti tuottaen vain heikkoja signaali-intensiteettejä *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus haemolyticus* ja *Staphylococcus saprophyticus* lajien kanssa. Myös E.gal_3 koetin tuotti positiivisia hybridisaatioreaktioita vain kolmen ei-kohdelajinsa kanssa, mutta sen tuottamat signaali-intensiteetit *E. faecium*in ja *Streptococcus agalactiae*in kanssa olivat melko voimakkaita. E.gal_6 tunnistuskoetin tuotti positiivisia hybridisaatioreaktioita viiden epäspesifisen lajin kanssa, mutta pääosin signaali-intensiteetit olivat melko matalia (noin 30—50 prosenttia enimmäisintensiteetistä). Tunnistuskoettimet E.gal_2, E.gal_7 ja E.gal_8 toimivat erittäin epäspesifisesti tuottaen positiivisia ja paikoin varsin voimakkaita signaali-intensiteettejä lukuisten ristireaktiopaneelin bakteerilajien kanssa.

*E. casseliflavus*ukselle suunnitellut tunnistuskoettimet toimivat huomattavasti *E. gallinarum*ille suunniteltuja spesifisemmin. Koettimet E.cas_1, E.cas_2, E.cas_5 ja E.cas_7 tuottivat kukin erittäin heikkoja signaaleita vain muutamien epäspesifisten lajien kanssa. Koettimet E.cas_3, E.cas_4 ja E.cas_6 toimivat puolestaan virheettömästi testatun ristireaktiopaneelin suhteen. Sen sijaan koetin E.cas_8 ja erityisesti koetin

E.cas_9 osoitti kumpikin voimakkaita ristireaktiotaipumuksia lukuisten bakteerilajien suhteen.

5.4 Herkkyystestaukset

E. casseliflavus tunnistusherkkyydeksi saatiin noin 130 000 genomiekvivalenttia/PCR-reaktio ja *E. gallinarum* tunnistusherkkyydeksi puolestaan noin 150 000 genomiekvivalenttia/PCR-reaktio. Molemmissa tapauksissa edellä mainituista bakteerimääristä tehdyt PCR-reaktiot tuottivat positiivisen hybridisaatioreaktion kaikkien neljän herkkyystestauksissa käytetyn tunnistuskoettimen kohdalla. Sen sijaan laimennossarjojen seuraavaksi vahvimmat näytteet tuottivat vastaavan tuloksen ainoastaan kahden neljästä tunnistuskoettimen kanssa. Kun tarkastellaan suunniteltujen tunnistuskoettimien ristireaktiotaipumuksia, ei näytteessä olevan patogeenin määrittystä voida kuitenkaan luotettavasti tehdä ainoastaan kahden koettimen perusteella etenkin *E. gallinarum* kohdalla.

Glykopeptidiresistenttien *E. faecalixen* ja *E. faecium* tunnistusherkkydet määräytyivät lajitunnistuksen mukaan, sillä sekä *vanA*- että *vanB*-geenit tunnistuivat vielä kaikilla tunnistuskoettimilla siinä vaiheessa kun lajitunnistuksen tuottavat *gyrB*-tunnistuskoettimet eivät enää tuottaneet positiivisia hybridisaatioreaktioita. Pelkän resistenssigeenin perusteella ei kuitenkaan voida osoittaa testatun näytteen sisältävän GRE:n, minkä vuoksi luotettavan tuloksen katsottiin sisältävän sekä bakteerilajitunnistuksen että resistenssigeenitunnistuksen. *vanA*-positiivisen *E. faecalixen* tunnistusherkkyydeksi muodostui noin 14 000 genomiekvivalenttia/PCR-reaktio, jolloin kaksi kolmesta tunnistuskoettimesta tuotti positiivisen signaalin. *VanB1*-positiivisen *E. faecalixen* tunnistusherkkyydeksi muodostui noin 1400 genomiekvivalenttia/PCR-reaktio, kun taas *vanB2*-positiivista kantaa käytettäessä vastaava arvo oli noin 140 genomiekvivalenttia/PCR-reaktio. *E. faecium* kohdalla tunnistusrajoiksi muodostuivat noin 15 000 genomiekvivalenttia/PCR-reaktio *vanA*-positiivista kantaa käytettäessä ja noin 1500 genomiekvivalenttia/PCR-reaktio sekä

vanB1- että *vanB2*-kantoja käytettäessä. Enterokokkien lajintunnistuksen herkkyys vaihtui siis sen mukaan, mikä resistenssityyppi oli kyseessä. Tämä johtunee pääosin siitä, että monikohde PCR:ssä eri kohdegeenien välille syntyy kilpailutilanne monistumisen suhteen. Tulosten perusteella *vanA*-geenin monistuminen oli erittäin tehokasta, jolloin samassa reaktiossa monistuneen *gyrB*-geenin monistus heikkeni suhteellisesti. Tuloksia tulkittaessa täytyy ottaa myös huomioon, että tutkimuksessa ei määritetty käytettyjen GRE-kantojen resistenssigeenien kopiomääriä. Tämän vuoksi tunnistusherkkyydet voivat vaihdella jopa samoja resistenssigeenejä kantavien enterokokkikantojen välillä, mikäli resistenssigeenien kopiomäärissä on merkittäviä eroja.

Saatujen herkkyysien riittävyyden arviointi sepsisdiagnoosiin on hankalaa, sillä positiivisten veriviljelyiden bakteerimääristä ei ole tarkkaa tietoa. Saadut tulokset eivät muutenkaan suoraan osoita testimenetelmien soveltuvuutta sepsisdiagnoosiin, sillä testit tehtiin puhdasviljelmistä eristettyjä DNA-näytteitä käyttäen ja positiivisista veriviljelypulloista tehdyt DNA-eristykset saattavat sisältää PCR:ää inhiboivia molekyylejä, joiden myötävaikutuksesta potilasnäytteiden testausherkyys saattaa olla edellä mainittua heikompi.

5.5 Testaus *Hôpital de bicêtre*'stä saaduilla puhdasviljelmäkannoilla

Yksitoista kahdestatoista mikrosirulla testatusta näytteestä tuotti identtisen tuloksen *Hôpital de bicêtre*n ilmoittamiin tietoihin verrattaessa. Poikkeavissa tuloksissa enterokokeille läheistä sukua oleva laktokokkinäyte tunnistui *E. gallinarumiksi*. Näyte sekvensoitiin tulosten tarkistamiseksi universaaleilla *gyrB*-alukkeilla. Sekvensoitua *L. gergoviae* *gyrB*-sekvenssiä verrattiin aiemmin sekvensoituihin *E. gallinarumin* *gyrB*-sekvensseihin. Tulokseksi saatiin 99,4 % ja 97 % sekvenssihomologiat *L. gergoviae* *gyrB*-sekvenssin ja kahden eri *E. gallinarumin* *gyrB*-varianttien välille. Sekvenssien väliset eroavuudet olivat satunnaisia yhden emäksen poikkeamia, joista yksikään ei osunut suunniteltujen tunnistuskoettimien kohdalle, mikä selittää saadun tuloksen.

6. Johtopäätökset

Tulosten perusteella voidaan sanoa, että lopulliseen testaukseen valikoituneet alukkeet ja tunnistuskoettimet soveltuvat hyvin kohdegeeniensä tunnistamiseen. Niiden soveltuvuutta sepsisdiagnostiikkaan tulisi kuitenkin arvoida erikseen positiivisilla veriviljelynäytteillä ja myös tutkimuksen lopputestausta suuremmalla otoksella. Lisäksi poikkeuksena voidaan mainita *E. gallinarumille* suunnitellut tunnistuskoettimet, joiden avulla ei voida erotella *L. gergoviaeta* *E. gallinarumista*. Sekvensointitulosten perusteella voidaan myös väittää, että mikäli kahden edellä mainitun lajin ristireagointia halutaan välttää, on syytä harkita jonkin muun geenialueen käyttöä, sillä kyseisten lajien *gyrB*-geenit ovat sekvensseiltään erittäin samankaltaiset. Se, onko kyseisten lajien erottelu edes relevanttia sepsisdiagnostiikan kannalta, on myös oleellista tunnistuskoettimien toimivuutta arvioitaessa. On myös mahdollista, että *Hôpital de bicêtren* käyttämä fenotyyppiseen tunnistukseen perustuvan viljelymenetelmän avulla kahta edellä mainittua lajia ei voida luotettavasti erotella, mikä vuoksi ei ole poissuljettua, että laktokokiksi tunnistettu bakteerikanta on todellisuudessa genotyybiltään *E. gallinarum*. Asian selvittämiseksi voitaisiin käyttää kokogenomisekvensointia.

Yleisesti ottaen tutkimuksessa käytetyn menetelmän etuina perinteiseen sepsisdiagnostiikkaan nähden voidaan pitää sen tarkkuutta ja nopeutta. Se on ensisijaisesti tarkoitettu positiivisten veriviljelynäytteiden testaukseen, joten sen ei voida katsoa tarjoavan vaihtoehtoa veriviljelylle, mutta useiden bakteerien ja antibioottivastustuskyvylle herkistävien geenien samanaikainen tunnistus mahdollistaa yksinkertaisemman ja nopeamman jatkotestauksen monisyisen ja tulkinnanvaraisen biokemiallisen testauksen sijaan, tuoden lisäarvoa nykyisin käytössä olevaan diagnostiikkaan.

7. Kiitokset

Haluaisin kiittää Mobidiag Oy:tä heidän tarjoamastaan mahdollisuudesta lopputyön tekemiseen. Kiitos myös kaikille työtovereilleni, jotka tekivät päivittäisestä puurtamisesta, ei ainoastaan siedettävää, vaan usein myös varsin hauskaa. Erityinen kiitos ohjaajalleni Minna Mäelle kärsivällisyydestä ja kultaakin kalliimmasta opista työn tekemisen ohessa kuin myös sitä edeltäneenä ja seuranneena aikana.

Erityiskiitos myös Yliopistonlehtori Kari Elolle kirjoittamisprosessin aikana annetuista neuvoista ja vinkeistä, joiden myötä työn loppuunsaattaminen olisi ollut merkittävästi hankalampaa, ellei peräti mahdotonta.

Kiitos myös kaikille ystävilleni, joiden ansiosta sain siirrettyä ajatuksiani myös pois lopputyön tekemisestä, välillä jopa liiaksikin.

Lopuksi sydämellinen kiitos ja kumarrus avupuolisolleni Fiinalle, äidilleni Annelle, isälleni Juhalle, siskolleni Netalle sekä tietysti kummipojalleni Severille, joka ilmestyi tähän maailmaan ilahduttamaan arkeani tämän lopputyön tekemisen aikana. Kiitos myös kaikille sukulaisilleni, erityismainintana vaarini Professori Olavi Huikari, jonka tieteelliset saavutukset ovat osaltaan inspiroineet minut ajautumaan luonnontieteiden pariin.

Lähdeluettelo

Abraham, E., Calandra, T., Cohen, J., Dellinger, R.P., Dhainault J-F., Marshall, J.C., Opal, S., Sprung, C.L. & Vincent, J. 2003, Promoting Better Understanding of Sepsis.

<http://internationalsepsisforum.com/sepsis-booklet>. International Sepsis Forum.

Viitattu 10.10.2013

- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. & Lipman, D.J. 1990. Basic Local Alignment Search Tool. *Journal of Molecular Biology* 215: 403-410.
- Angus, D.C. & Wax, R.S. 2001. Epidemiology of sepsis: An update. *Critical Care Medicine* 29: 109-116.
- Annane, D., Bellissant, E., Bollaert, P.E., Briegel, J., Keh, D. & Kupfer, Y. 2004. Corticosteroids for severe sepsis and septic shock: a systematic review and meta-analysis. *British Medical Journal (International Edition)* 329: 480-484.
- Arduino, R.C., Jacques-Palaz, K., Murray, B.E. & Rakita, R.M. 1994. Resistance of *Enterococcus faecium* to neutrophil-mediated phagocytosis. *Infection and Immunity* 62: 5587-5594.
- Arpi, M., Bentzon, M.W., Jensen, J. & Frederiksen, W. 1989. Importance of blood volume cultured in the detection of bacteremia. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 8: 838-842.
- Arthur, M., Molinas, C. & Courvalin, P. 1992. The VanS-VanR two-component regulatory system controls synthesis of depsipeptide peptidoglycan precursors in *Enterococcus faecium* BM4147. *Journal of Bacteriology* 174: 2582-2591.
- Arthur, M., Molinas, C., Dutka-Malen, S. & Courvalin, P. 1991. Structural relationship between the vancomycin resistance protein VanH and 2-hydroxycarboxylic acid dehydrogenases. *Gene* 103: 133-134.
- Arthur, M. & Quintiliani, R.J. 2001. Regulation of VanA- and VanB-type glycopeptide resistance in *Enterococci*. *Antimicrobial Agents & Chemotherapy* 45: 375-381.

Ayala, A., Perl, M., Venet, F., Lomas-Neira, J., Swan, R. & Chun-Shiang, C. 2008.

Apoptosis in Sepsis: Mechanisms, Clinical Impact and Potential Therapeutic Targets. *Current Pharmaceutical Design* 14: 1853-1859.

Baron, E.J., Cox, M., Heyliger, M., Miller, M.J., Ruoff, K.L., Weinstein, M.P. & York, M.K.

2002. Abbreviated Identification of Bacteria and Yeast; Approved Guideline.

Guideline painos. Pennsylvania, USA: Clinical and Laboratory Standards Institute.

Beekmann, S.E., Diekema, D.J., Chapin, K.C. & Doern, G.V. 2003. Effects of rapid

detection of bloodstream infections on length of hospitalization and hospital charges. *Journal of Clinical Microbiology* 41: 3119-3125.

Bernard, G.R., Vincent, J.L., Laterre, P.F., LaRosa, S.P., Dhainaut, J.F., Lopez-Rodriguez,

A., Steingrub, J.S., Garber, G.E., Helterbrand, J.D., Ely, E.W. & Fisher, C.J. 2001.

Efficacy and safety of recombinant human activated protein C for severe sepsis. *N Engl J Med* 344: 699-709.

Billot-Klein, D., Gutmann, L., Sable, S., Guittet, E. & van Heijenoort, J. 1994.

Modification of peptidoglycan precursors is a common feature of the low-level vancomycin-resistant VANB-type enterococcus D366 and of the naturally glycopeptide-resistant species *Lactobacillus casei*, *Pediococcus pentosaceus*, *leuconostoc mesenteroides*. *Journal of Bacteriology* 176: 2398-2405.

Bone, R.C., Balk, R.A., Cerra, F.B., Dellinger, R.P., Fein, A.M., Knaus, W.A., Schein, R.M.

& Sibbald, W.J. 1992. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. 1992. *Chest* 101: 1644-1655.

- Bouza, E., Sousa, D., Rodríguez-Créixems, M., Lechuz, J.G. & Muñoz, P. 2007. Is the volume of blood cultured still a significant factor in the diagnosis of bloodstream infections? *Journal of Clinical Microbiology* 45: 2765-2769.
- Brown, K.A., Brain, S.D., Pearson, J.D., Edgeworth, J.D., Lewis, S.M. & Treacher, D.F. 2006. Neutrophils in development of multiple organ failure in sepsis. *Lancet* 368: 157-169.
- Bugg, T.D.H., Wright, G.D., Dutka-Malen, S., Arthur, M., Courvalin, P. & Walsh, C.T. 1991. Molecular basis for vancomycin resistance in *enterococcus faecium* BM4147: Biosynthesis of a depsipeptide peptidoglycan precursor by vancomycin resistance proteins vanH and VanA. *Biochemistry* 30: 10408-10415.
- Cetinkaya, Y., Falk, P. & Mayhall, G.C. 2000. Vancomycin-resistant enterococci. *Clinical Microbiology Reviews* 13: 686-707.
- Chenoweth, C. & Schaberg, D. 1990. The epidemiology of enterococci. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases: official publication of the European Society of Clinical Microbiology* 9: 80-89.
- Chow, J.W., Thal, L.A., Perri, M.B., Vazquez, J.A., Donabedian, S.M., Clewell, D.B. & Zervos, M.J. 1993. Plasmid-associated hemolysin and aggregation substance production contribute to virulence in experimental enterococcal endocarditis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 37: 2474-2477.
- Clark, N.C., Teixeira, L.M., Facklam, R.R. & Tenover, F.C. 1998. Detection and differentiation of vanC-1, vanC-2, and vanC-3 glycopeptide resistance genes in enterococci. *Journal of Clinical Microbiology* 36: 2294-2297.

- Clewell, D.B. 1990. Movable genetic elements and antibiotic resistance in enterococci. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 9: 90-102.
- Cockerill III, F.R. 1998. Conventional and genetic laboratory tests used to guide antimicrobial therapy. *Mayo Clinic Proceedings* 73: 1007-1021.
- Courvalin, P. 2006. Vancomycin resistance in gram-positive cocci. *Clinical Infectious Diseases* 42: 25-34.
- Dahl, K.H., Simonsen, G.S., Olsvik, O. & Sundsfjord, A. 1999. Heterogeneity in the vanB gene cluster of genomically diverse clinical strains of vancomycin-resistant enterococci. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 43: 1105-1110.
- Davey, P.G. 2008. Appropriate vs. inappropriate antimicrobial therapy. *Clinical Microbiology & Infection*: 15-21.
- Dutta, I. & Reynolds, P.E. 2003. The vanC-3 vancomycin resistance gene cluster of *Enterococcus flavescens* CCM 439. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 51: 703-706.
- Dutta, I. & Reynolds, P.E. 2002. Biochemical and genetic characterization of the vanC-2 vancomycin resistance gene cluster of *Enterococcus casseliflavus* ATCC 25788. *Antimicrob Agents Chemother* 46: 3125-3132.
- Evers, S. & Courvalin, P. 1996. Regulation of VanB-type vancomycin resistance gene expression by the VanS(B)-VanR (B) two-component regulatory system in *Enterococcus faecalis* V583. *Journal of Bacteriology* 178: 1302-1309.
- Facklam, R.R. & Collins, M.D. 1989. Identification of enterococcus species isolated from human infections by a conventional test scheme. *Journal of Clinical Microbiology* 27: 731-734.

- Fenollar, F. & Raoult, D. 2007. Molecular diagnosis of bloodstream infections caused by non-cultivable bacteria. *International Journal of Antimicrobial Agents*: 7-15.
- Fisher, K. & Phillips, C. 2009. The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. *Microbiology* 155: 1749-1757.
- Flemingham, D. & Brown, D.F.J. 2001. Intrumentation in antimicrobial susceptibility testing. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 48 (Suppl. S1): 81-85.
- Gold, H.S. & Moellering, R.C. 1996. Antimicrobial-Drug Resistance. *The New England Journal of Medicine* 335: 1445-1453.
- Gutschik, E., Møller, S. & Christensen, N. 1979. Experimental endocarditis in rabbits. 3. Significance of the proteolytic capacity of the infecting strains of *Streptococcus faecalis*. *Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica. Section B, Microbiology* 87: 353-362.
- Guzman, C.A., Pruzzo, C., LiPira, G. & Calegari, L. 1989. Role of adherence in pathogenesis of *Enterococcus faecalis* urinary tract infection and endocarditis. *Infection and immunity* 57: 1834-1838.
- Harding, G.K. & Ronald, A.R. 1974. A controlled study of antimicrobial prophylaxis of recurrent urinary infection in women. *New England Journal of Medicine* 291: 597-601.
- Howard, D., Cordell, R., McGowan Jr, J.E., Packard, R.M., Scott II, R.D. & Solomon, S.L. 2001. Measuring the Economic Costs of Antimicrobial Resistance in Hospital Settings: Summary of the Centers for Disease Control and Prevention-Emory Workshop. *Clinical Infectious Diseases* 33: 1573-1578.

- Ike, Y., Hashimoto, H. & Clewell, D.B. 1987. High incidence of hemolysin production by *Enterococcus (Streptococcus) faecalis* strains associated with human parenteral infections. *Journal of Clinical Microbiology* 25: 1524-1528.
- Isaacman, D.J., Karasic, R.B., Reynolds, E.A. & Kost, S.I. 1996. Effect of number of blood cultures and volume of blood on detection of bacteremia in children. *Journal of Pediatrics* 128: 190-195.
- Jorgensen, J.H., Barry, A.L., Traczewski, M.M., Sahm, D.F., McElmeel, M.L. & Crawford, S.A. 2000. Rapid automated antimicrobial susceptibility testing of *Streptococcus pneumoniae* by use of the bioMerieux VITEK 2. *Journal of Clinical Microbiology* 38: 2814-2818.
- Järvinen, A.K., Laakso, S., Piiparinen, P., Aittakorpi, A., Lindfors, M., Huopaniemi, L., Piiparinen, H. & Maki, M. 2009. Rapid identification of bacterial pathogens using a PCR- and microarray-based assay. *BMC Microbiology* 9: 161-170.
- Kalina, A.P. 1970. The taxonomy and nomenclature of enterococci. *International Journal of Systematic Bacteriology* 20: 185-189.
- LeClercq, R., Derlot, E., Weber, M., Duval, J. & Courvalin, P. 1989. Transferable vancomycin and teicoplanin resistance in *Enterococcus faecium*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 33: 10-15.
- Mancini, N., Carletti, S., Ghidoli, N., Cichero, P., Burioni, R. & Clementi, M. 2010. The era of molecular and other non-culture-based methods in diagnosis of sepsis. *Clinical Microbiology Reviews* 23: 235-251.

- Mermel, L.A. & Maki, D.G. 1993. Detection of Bacteremia in Adults: Consequences of Culturing an Inadequate Volume of Blood. *Annals of Internal Medicine* 119: 270-272.
- Munson, E.L., Diekema, D.J., Beekmann, S.E., Chapin, K.C. & Doern, G.V. 2003. Detection and treatment of bloodstream infection: Laboratory reporting and antimicrobial management. *Journal of Clinical Microbiology* 41: 495-497.
- Murray, B.E. 1990. The life and times of the Enterococcus. *Clinical microbiology Reviews* 3: 46-65.
- Murray, P.R., Baron, E.J., Jorgensen, J.H., Landry, L.M. & Pfaller, M.A. 2007. *Enterococcus*. Teoksessa: P.R. Murray, E.J. Baron, J.H. Jorgensen, L.M. Landry & M.A. Pfaller (toim.). *Manual of Clinical Microbiology*. 9 painos. Washington, D.C.: ASM Press: 430-442.
- Nadel, S., Goldstein, B., Williams, M.D., Dalton, H., Peters, M., Macias, W.L., Abd-Allah, S.A., Levy, H., Angle, R., Wang, D., Sundin, D.P. & Giroir, B. 2007. Drotrecogin alfa (activated) in children with severe sepsis: a multicentre phase III randomised controlled trial. *Lancet* 369: 836-843.
- Naser, S.M., Vancanneyt, M., Hoste, B., Snauwaert, C., Vandemeulebroecke, K. & Swings, J. 2006. Reclassification of *Enterococcus flavescens* Pompei et al. 1992 as a later synonym of *Enterococcus casseliflavus* (ex Vaughan et al. 1979) Collins et al. 1984 and *Enterococcus saccharominimus* Vancanneyt et al. 2004 as a later synonym of *Enterococcus italicus* Fortina et al. 2004. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 56: 413-416.

- Nieto, M. & Perkins, H.R. 1971. Modifications of the acyl-D-alanyl-D-alanine terminus affecting complex-formation with vancomycin. *Biochemical Journal* 123: 789-803.
- Patel, G.P. & Balk, R.A. 2012. Systemic steroids in severe sepsis and septic shock. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 185: 133-139.
- Patel, R., Uhl, J.R., Kohner, P., Hopkins, M.K., Steckelberg, J.M., Kline, B. & Cockerill III, F.R. 1998. DNA sequence variation within *vanA*, *vanB*, *vanC-1*, and *vanC-2/3* genes of clinical *Enterococcus* isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 42: 202-205.
- Patterson, J.E., Sweeney, A.H., Simms, M., Carley, N., Mangi, R., Sabetta, J. & Lyons, R.W. 1995. An analysis of 110 serious enterococcal infections: Epidemiology, antibiotic susceptibility, and outcome. *Medicine* 74: 191-200.
- Peterson, J.W. 1996. Chapter 7: Bacterial Pathogenesis. Teoksessa: S. Baron (toim.). *Medical Microbiology*. 4th Edition painos. Texas, USA: University of Texas Medical Branch at Galveston.
- Remick, D.G. 2007. Pathophysiology of sepsis. *American Journal of Pathology* 170: 1435-1444.
- Reynolds, P.E. 1989. Structure, biochemistry and mechanism of action of glycopeptide antibiotics. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 8: 943-950.
- Reynolds, P.E., Depardieu, F., Dutka-Malen, S., Arthur, M. & Courvalin, P. 1994. Glycopeptide resistance mediated by enterococcal transposon Tn1546 requires production of VanX for hydrolysis of D-alanyl-D-alanine. *Molecular Microbiology* 13: 1065-1070.

- Sahm, D.F., Free, L. & Handwerger, S. 1995. Inducible and constitutive expression of vanC-1-encoded resistance to vancomycin in *Enterococcus gallinarum*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 39: 1480-1484.
- Schaberg, D.R., Culver, D.H. & Gaynes, R.P. 1991. Major Trends in the Microbial Etiology of Nosocomial Infection. *American Journal of Medicine* 91: 72-75.
- Schleifer, K.H. & Kilpper-Balz, R. 1984. Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the genus *Enterococcus* nom. rev. as *Enterococcus faecalis* comb. nov. and *Enterococcus faecium* comb. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* 34: 31-34.
- Schwetz, I., Hinrichs, G., Reisinger, E.C., Krejs, G.J., Olschewski, H. & Krause, R. 2007. Delayed processing of blood samples influences time to positivity of blood cultures and results of gram stain-acridine orange leukocyte cytospin test. *Journal of Clinical Microbiology* 45: 2691-2694.
- Tissari, P., Zumla, A., Tarkka, E., Mero, S., Savolainen, L., Vaara, M., Aittakorpi, A., Laakso, S., Lindfors, M., Piiparinen, H., Maki, M., Carder, C., Huggett, J. & Gant, V. 2010. Accurate and rapid identification of bacterial species from positive blood cultures with a DNA-based microarray platform: an observational study. *Lancet* 375: 224-230.
- Upadhyaya, P.G., Umapathy, B. & Ravikumar, K. 2010. Comparative study for the presence of enterococcal virulence factors gelatinase, hemolysin and biofilm among clinical and commensal isolates of *Enterococcus Faecalis*. *Journal of Laboratory Physicians* 2: 100-104.

- Vergis, E.N., Shankar, N., Chow, J.W., Hayden, M.K., Snyderman, D.R., Zervos, M.J., Linden, P.K., Wagener, M.M. & Muder, R.R. 2002. Association between the presence of enterococcal virulence factors gelatinase, hemolysin, and enterococcal surface protein and mortality among patients with bacteremia due to *Enterococcus faecalis*. *Clinical Infectious Diseases* 35: 570-575.
- Watanabe, S., Kobayashi, N., Quinones, D., Hayakawa, S., Nagashima, S., Uehara, N. & Watanabe, N. 2009. Genetic Diversity of the Low-Level Vancomycin Resistance Gene *vanC-2/vanC-3* and Identification of a Novel *vanC* Subtype (*vanC-4*) in *Enterococcus casseliflavus*. *Microbial Drug Resistance: Mechanism, Epidemiology, & Disease* 15: 1-9.
- Weber, S.G. & Gold, H.S. 2003. *Enterococcus*: An emerging pathogen in hospitals. *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine* 24: 49-59.
- Wells, C.L., Jechorek, R.P. & Erlandsen, S.L. 1990. Evidence for the translocation of *Enterococcus faecalis* across the mouse intestinal tract. *J Infect Dis* 162: 82-90.
- Werner, G., Coque, T.M., Hammerum, A.M., Hope, R., Hryniewicz, W., Johnson, A., Klare, I., Kristinsson, K.G., Leclercq, R., Lester, C.H., Lillie, M., Novais, C., Olsson-Liljequist, B., Peixe, L.V., Sadowy, E., Simonsen, G.S., Top, J., Vuopio-Varkila, J., Willems, R.J., Witte, W. & Woodford, N. 2008. Emergence and spread of vancomycin resistance among enterococci in Europe. *Euro Surveillance* 13: 1-11.
- Werner, G., Strommenger, B. & Witte, W. 2008. Acquired vancomycin resistance in clinically relevant pathogens. *Future Microbiology* 3: 547-562.
- Wilson, M.L., Mitchell, M., Morris, A.J., Murray, P.R., Reimer, L.G., Reller, L.B., Towns, M., Weinstein, M.P., Wellstood, S.A., Dunne, M.W., Jerris, R.C. & Welch, D.F. 2007,

Principles and Procedures for Blood Cultures; Approved Guideline (M47-A). ,
Pennsylvania, USA, Clinical and Laboratory Standards Institute.

Zeng, J., Teng, F., Weinstock, G.M. & Murray, B.E. 2004. Translocation of *Enterococcus faecalis* strains across a monolayer of polarized human enterocyte-like T84 cells. *Journal of Clinical Microbiology* 42: 1149-1154.